

**BEEINFLUSSUNG EINIGER FUNKTIONEN
NEUTROPHILER GRANULOZYTEN
DES SCHWEINES DURCH
ECHINACEAHALTIGE PRÄPARATE**

MARTIN STAHL

Disbui. München

1988





Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Institut für
Physiologie, Physiologische Chemie und Ernährungsphysiologie
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
Geschäftsführender Vorstand: Prof. Dr. H. Zucker

Angefertigt unter Leitung von
Prof. Dr. U. Lösch

**BEEINFLUSSUNG EINIGER FUNKTIONEN NEUTROPHILER GRANULOZYTEN
DES SCHWEINES DURCH ECHINACEAHALTIGE PRÄPARATE**

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
MARTIN STAHL
aus
Schwäbisch Gmünd

München 1988

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan:	Prof. Dr. M. Rüsse
Referent:	Prof. Dr. U. Lösch
Korreferent:	Prof. Dr. H. Berner

Tag der Promotion: 29. Juli 1988

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

1	EINLEITUNG	1
2	LITERATUR	2
2.1	<u>Reifung und Struktur des Neutrophilen Granulozyten</u>	2
2.2	<u>Funktionen des Neutrophilen Granulozyten</u>	5
2.2.1	Adhärenz und Diapedese	5
2.2.2	Chemotaxis	5
2.2.3	Phagozytose	7
2.2.4	Mikrobizidie	8
2.2.5	Wechselwirkungen	10
2.3	<u>Granulozytenrezeptoren</u>	11
2.4	<u>In vitro-Methoden zur Beurteilung von Granulozytenfunktionen</u>	14
2.4.1	Adhärenz	14
2.4.2	Chemotaxis	15
2.4.3	Phagozytose	16
2.4.4	Chemolumineszenz	16
2.5	<u>Modulation von Granulozytenfunktionen durch echinaceaehaltige Präparate</u>	18
3	MATERIAL UND METHODEN	19
3.1	<u>Leukozytenzählung</u>	19
3.2	<u>Differentialblutbild</u>	19
3.3	<u>Adhärenztest</u>	19
3.3.1	Versuchsaufbau	19
3.3.2	Auswertung	20
3.4	<u>Chemotaxistest</u>	21
3.4.1	Agarplatten	21
3.4.2	Serumaktivierung	21
3.4.3	Versuchsaufbau	22
3.4.4	Auswertung	22
3.5	<u>Phagozytostest</u>	23
3.5.1	Testprinzip	23
3.5.2	Granulozytenisolation	23
3.5.3	Hefezellsuspension	24
3.5.4	Schweineserumpool	24
3.5.5	Fetaler Schweineserumpool	25
3.5.6	Opsonisierung	25
3.5.7	Vorinkubation	25
3.5.8	Phagozytoseansatz	25
3.5.9	Stoppen der Phagozytose	25

3.5.10	Randomisierung der Proben	26
3.5.11	Färbung	26
3.5.12	Herstellung der Präparate	26
3.5.13	Auswertung	26
3.5.14	Stimulation in vitro, Versuchsaufbau	28
3.5.14.1	Testsubstanzen	28
3.5.14.2	Konzentrationsvorversuch	29
3.5.14.3	Substanzendversuch	29
3.5.15	Stimulation in vivo, Versuchsaufbau	30
3.5.15.1	Tiermaterial	30
3.5.15.2	Testsubstanz	30
3.5.15.3	Zeitplan der Injektionen und Blutentnahmen	31
3.5.15.4	Parallelansätze	32
3.5.16	Serumeinfluß	32
3.5.16.1	Inaktivierung	32
3.5.16.2	Versuchsaufbau	32
3.5.17	Färbemethodik Trypanblau/Eosin	33
3.5.17.1	Vorfärbung Hefe	33
3.5.17.2	Herstellung der Präparate	33
3.6	<u>Chemolumineszenztest</u>	35
3.6.1	Opsonisierung Zymosan	35
3.6.2	Luminollösung	35
3.6.3	Versuchsaufbau	35
3.6.4	Auswertung	36
3.7	<u>Statistik</u>	36
4	ERGEBNISSE	37
4.1	<u>Leukozytenzählung</u>	37
4.2	<u>Differentialblutbild</u>	37
4.3	<u>Adhärenztest</u>	37
4.4	<u>Chemotaxistest</u>	41
4.5	<u>Phagozytostest</u>	43
4.5.1	Granulozytenisolation	43
4.5.2	Stimulation in vitro	43
4.5.2.1	Konzentrationsvorversuch	43
4.5.2.2	Substanzendversuch	48
4.5.3	Stimulation in vivo	54
4.5.3.1	Blutbilder	54
4.5.3.2	Phagozytoseraten	56
4.5.4	Serumeinfluß	58
4.6	<u>Chemolumineszenztest</u>	59

5	DISKUSSION	63
5.1	<u>Blutbilder</u>	63
5.2	<u>Adhärenz</u>	63
5.2.1	Methode	63
5.2.2	Ergebnisse	64
5.3	<u>Chemotaxis</u>	64
5.3.1	Methode	64
5.3.2	Ergebnisse	65
5.4	<u>Phagozytose</u>	66
5.4.1	Methode	66
5.4.2	Ergebnisse	68
5.4.2.1	Konzentrationsvorversuch	69
5.4.2.2	Substanzendversuch	70
5.4.2.3	In vivo-Versuch	72
5.4.2.4	Serumeinfluß	73
5.5	<u>Chemolumineszenz</u>	74
5.5.1	Methode	74
5.5.2	Ergebnisse	74
5.6	<u>Beeinflussung der Granulozytenfunktionen durch Influx</u>	76
6	ZUSAMMENFASSUNG	78
7	SUMMARY	79
8	TABELLARISCHER ANHANG	80
9	LITERATURVERZEICHNIS	95

» There is at bottom only one genuinely scientific treatment for all diseases, and that is to stimulate the phagocytes. Stimulate the phagocytes. «

(G. B. Shaw: The Doctor's Dilemma, 1906)



1 EINLEITUNG

Neutrophilen Granulozyten kommt im Abwehrsystem von Säugetieren eine wichtige Rolle als schnell reagierender Schutzmechanismus gegen eingedrungene Mikroorganismen und Fremdpartikel zu. Dabei kann durch die Phagozytose ein breites Spektrum von pathogenen Keimen aufgenommen und unschädlich gemacht werden. Für ein Wirksamwerden der Neutrophilen Granulozyten ist eine vorhergehende oder längerdauernde Auseinandersetzung mit dem jeweiligen Keim nicht Bedingung; mithin erfüllen Neutrophile Granulozyten ihre Aufgaben vor allem im Rahmen der unspezifischen Abwehr.

Damit Neutrophile Granulozyten ihren Funktionen gezielt nachkommen können, ist der Ablauf einer komplexen Ereigniskette Voraussetzung. Im Bereich des Eindringens von Keimen müssen zirkulierende Granulozyten den Blutstrom verlassen und die Gefäßwand durchdringen. Im Gewebe wandern sie aktiv auf den Ort der Infizierung zu und versuchen, dort angelangt, Fremdkeime in sich aufzunehmen. Die sich anschließende Auseinandersetzung mit dem in Phagosomen eingeschlossenen Material erfordert eine große Stoffwechselleistung des Phagozyten.

Krankheitsbilder, an deren Pathogenese Mikroorganismen beteiligt sind, treten heute immer seltener als klassische, monokausale Infektionskrankheiten auf. Vielmehr gewinnen die sogenannten infektiösen Faktorenkrankheiten mehr und mehr an Bedeutung. Wechselnde Erregerspektren und zunehmende Resistenzen gegen Antibiotika und Chemotherapeutika erschweren die Immunprophylaxe und Therapie dieser Krankheiten. Die Stimulierung von unspezifischen Abwehrmechanismen erscheint als geeignetes Mittel, um diesen Problemen zu begegnen.

Eine Wirkung von echinaceahaltigen Präparaten auf verschiedene Teile des Abwehrsystems wurde bei mehreren Spezies nachgewiesen. Diese Arbeit untersucht den Einfluß derartiger Präparationen auf einige Funktionen Neutrophiler Granulozyten des Schweines.

2 LITERATUR

2.1 Reifung und Struktur des Neutrophilen Granulozyten

Die frühesten Vorläufer der hämopoetischen Stammzelle, von denen die Zellen der granulozytären Reihe abstammen, lassen sich erstmals in der Dottersackwand nachweisen. Im weiteren Verlauf der Gestation erfolgt die Myelopoese dann überwiegend in der Leber, später auch in Milz und Knochenmark. Postnatal findet die Bildung von Granulozyten beim gesunden Individuum nur noch im Knochenmark statt (ROITT et al., 1985).

Aus der pluripotenten, hämopoetischen Stammzelle des Knochenmarkes entstehen durch Mitosen sowohl weitere pluripotente Stammzellen, als auch solche Vorläuferzellen, die in ihrer Weiterentwicklung auf die myeloische Reihe festgelegt sind. Morphologisch sind diese beiden Zellen nicht exakt definierbar (KLEBANOFF and CLARK, 1978). Aus der Vorläuferzelle gehen Myeloblasten hervor, die noch keine Granula bilden.

In der folgenden Zellgeneration, den Promyelozyten, werden als Produkte des Golgi-Apparates erstmals Granula nachweisbar: die primären oder azurophilen Granula. Mit dem Ende der Bildung primärer Granula teilt sich der Promyelozyt und es entsteht der Myelozyt. Myelozyten bilden die sekundären oder spezifischen Granula. Gegen Ende des Myelozytenstadiums wird die "Produktionsmaschinerie" der Zelle erheblich reduziert. Aus einer letzten Mitose gehen die Metamyelozyten hervor, die sich durch eine Umformung des Zellkernes zunächst in die stabkernigen, dann in die segmentkernigen Granulozyten wandeln (BAGGIOLINI, 1982).

Die Freisetzung von Neutrophilen Granulozyten aus dem Knochenmark wird unter anderem durch Interleukin 1, Komplementbruchstücke, Nebennierenrindenhormone und auch Endotoxine in niedrigen Konzentrationen ausgelöst (MOVAT, 1985). Morphologisch sind Neutrophile Granulozyten durch ihren unregelmäßig geformten Zellkern und die typische Granulation des Zytoplasmas gekennzeichnet (BARGMANN, 1977). Die Granula der Neutrophilen Granulozyten unterscheiden sich in ihrem Enzymgehalt.

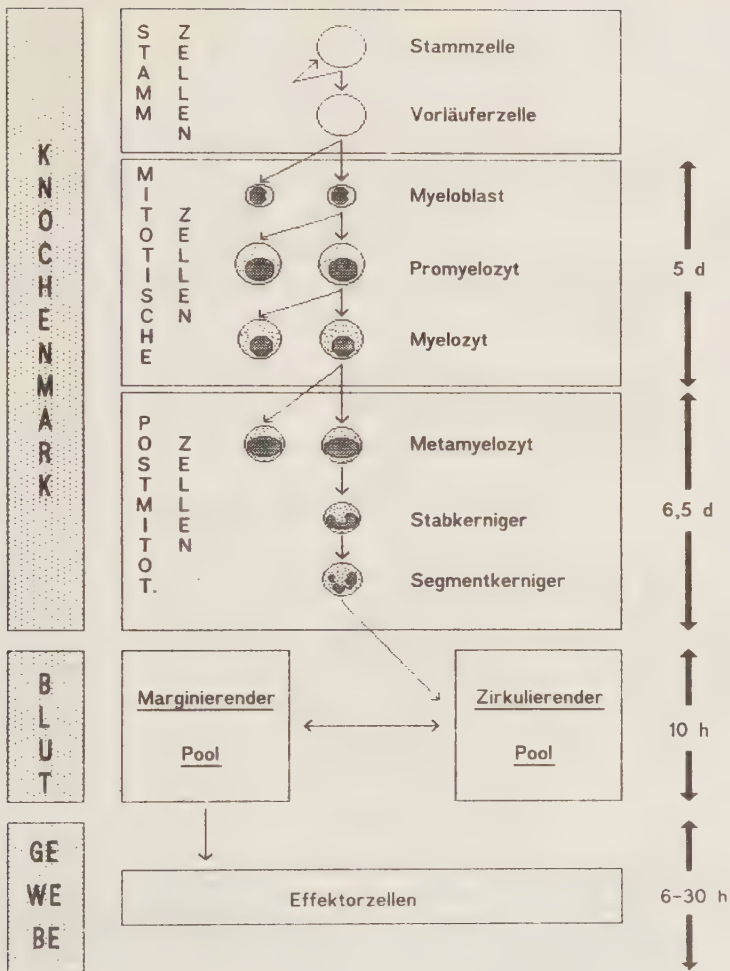


Abb. 2.1: Granulopoese und Verweildauer der einzelnen Zellpopulationen in den jeweiligen Kompartimenten beim Menschen. (nach MOVAT, 1985)

Folgende Bestandteile wurden in Neutrophilen des Menschen (BAGGIOLINI and DEWALD, 1985) und, soweit untersucht, auch in denen des Schweines (KLEBANOFF and CLARK, 1978) nachgewiesen:

	AZUROPHILE	SPEZIFISCHE
	GRANULA	
MIKROBIZIDE ENZYME	Myeloperoxidase	
	Lysozym	Lysozym
NEUTRALE PROTEASEN	Elastase	
	Kathepsin G	
	Proteinase 3	
		Kollagenase
SAURE HYDROLASEN	N-acetyl- β -Glukos-aminidase	
	Kathepsin B	
	Kathepsin D	
	β -Glukuronidase	
	β -Glyzerophosphatase	
	α -Mannosidase	
AUSSERDEM		Laktoferrin
		Vitamin B ₁₂ -bindende
		Proteine

2.2 Funktionen des Neutrophilen Granulozyten

2.2.1 Adhärenz und Diapedese

Neutrophile Granulozyten nehmen ihre Abwehrfunktionen zum überwiegenden Teil nicht im stömenden Blut, sondern im Gewebe wahr (BROWN, 1986). Voraussetzung für das Auswandern von Leukozyten aus den postkapillären Venolen sind Veränderungen der Mikrozirkulation, wie sie im Rahmen eines Entzündungsgeschehens auftreten. Im Bereich des Entzündungsherdes verlassen vermehrt Neutrophile Granulozyten den zentralen Blutstrom und nehmen vereinzelt Kontakt mit der Gefäßwand auf (Margination).

Der Margination folgt die Adhärenz an die Endothelzellen. Die Aneinanderlagerung von Zellen, die beide eine negative Oberflächenladung tragen, wird wahrscheinlich durch divalente Kationen vermittelt (GORDON and KOJ, 1985). Daneben führen Entzündungsmediatoren zu Oberflächenveränderungen der Endothelzellen und Granulozyten, die die Adhärenz begünstigen (MOVAT, 1985).

Der adhärierte Granulozyt schiebt Pseudopodien zwischen die Zell-Zell-Verbindungen zweier Endothelzellen und passiert unter maximaler Deformation seiner Zellgestalt den Interzellularspalt (GAETHGENS, 1984). Das Durchdringen der Basalmembran wird durch Freisetzen von geringen Mengen Kollagenase und Elastase erleichtert (TARGOWSKI and NIEMIALTOWSKI, 1986). Der gesamte Vorgang der Diapedese dauert etwa 2-10 Minuten (GORDON and KOJ, 1985).

2.2.2 Chemotaxis

Neutrophile Granulozyten sind etwa 6 Stunden nach Setzen eines Entzündungsreizes im Entzündungsherd anzutreffen (GORDON and KOJ, 1985). Die Wanderung auf die Noxe zu erfolgt entgegen einem chemotaktischen Gradienten. Folgende Substanzen können in vivo chemotaktisch wirksam sein (VALERIUS, 1984):

ENDOGENE CHEMOTAXINE

Plasmatischer Herkunft:	C5a C5a _{des Arg} Fibrin/-ogenspaltprodukte u.a.
Zellulärer Herkunft:	Leukotrien B4 (LTB4) Plättchen-Aktivierender- Faktor (PAF) Lymphokine Interleukin 1 (IL 1) u.a.

EXOGENE CHEMOTAXINE

Bakterielle Peptide

Wandernde Granulozyten haben eine charakteristische Gestalt: am "vorderen" Ende der Zelle sind mehrere Pseudopodien ausgebildet, in denen sich direkt unter der Zellmembran zahlreiche Mikrofilamente befinden. Die Mehrzahl der Granula und übrigen Zellorganellen liegt im Bereich hinter den Pseudopodien. Der Zellkern findet sich im hinteren Drittel der Zelle. Häufig stellt sich auch am "hinteren" Zellende ein Zytoplasmaausläufer dar, das Uropod. Für die gerichtete Anordnung der Zellstrukturen ist ein funktionsfähiges Mikrotubulus-System wichtig, während die Pseudopodienbildung auf der Wirkung der Mikrofilamente beruht (GALLIN et al., 1978, SNYDERMAN and GOETZL, 1981).

Wandernde Granulozyten ändern sehr häufig die Richtung. Während diese Richtungsänderungen bei Fehlen eines chemotaktischen Gradienten rein zufällig erfolgen, führen sie im Gradienten zu einer gezielten Bewegung in Richtung höherer Konzentration des Chemotaxins (CHEUNG and MILLER, 1984). Die Geschwindigkeit, mit der sich Phagozyten im Gewebe fortbewegen, beträgt 10-40 µm/min (COTTIER et al., 1980). Negative Chemotaxis ist bei Granulozyten nicht bekannt (VALERIUS, 1984). Wandernde Neutrophile Granulozyten setzen selbst Chemotaxine frei

(z.B. LTB₄) oder fördern deren Bildung (z.B. Aktivierung des alternativen Komplementweges durch während der Chemotaxis freigesetzte Granulaenzyme) und führen so zu einer Verstärkung der zellulären Antwort (WRIGHT and GALLIN, 1979, GORDON and KOJ, 1985).

Am Entzündungsherd angekommen werden die Neutrophilen Granulozyten nicht nur durch das Fehlen eines chemotaktischen Gradienten immobilisiert, vielmehr setzen die dort herrschenden hohen Konzentrationen von Chemotaxinen die Beweglichkeit der Phagozyten herab und stimulieren die Phagozytoseaktivität (BASS et al., 1978, STICKLE et al., 1986).

2.2.3 Phagozytose

Eine mögliche Bedeutung in der Abwehr von pathogenen Keimen wurde beweglichen, zur Phagozytose fähigen Zellen erstmals 1882 von E. Metschnikoff zugeschrieben. Er forderte, daß durch Phagozytose - Endozytose als Phänomen bei Protozoen war schon bekannt - in den Organismus eingedrungene Bakterien (deren Rolle als mögliche Krankheitserreger erst kurz, seit den Forschungen von Pasteur und Koch bekannt war) im Rahmen einer Abwehrreaktion wirksam bekämpft und unschädlich gemacht werden können (KARNOVSKY and BOLIS, 1982).

Jede Anlagerung und Aufnahme von Phagozytosepartikeln wird über Rezeptoren auf der Zellmembran des Granulozyten vermittelt (WRIGHT and SILVERSTEIN, 1986). Die effektive Phagozytose eines Mikroorganismus bzw. Partikels wird durch Anlagerung bestimmter Serumproteine an seine Oberfläche begünstigt: Opsonisierung.

Als OPSONINE sind wirksam:

Komplementbruchstücke (C3b, C3bi, C4b, C1q)
Immunglobuline der Klasse G (insbesondere IgG1 und IgG3)
Fibronectin (CAIN et al., 1987) und
IgA (YEAMAN and KERR, 1987).

Die Inkorporation kann nur ablaufen, wenn die gesamte Oberfläche des Phagozytosepartikels mit geeigneten Liganden besetzt ist (SMITH and LUMSDEN, 1983). Pseudopodien des Phagozyten umfließen dabei den Partikel, wobei es zu einem "reißverschlußartigen", fortgesetzten Ineinandergreifen von Rezeptoren und Liganden kommt ("Zipper-Mechanismus", GRIFFIN et al., 1975).

Die Ausbildung der Pseudopodien wird durch den kontraktilen Apparat der Zelle bewirkt: Beim ruhenden Phagozyten finden sich im subkortikalen Zytoplasma Aktinfilamente, die durch Aktin-Bindendes-Protein (ABP) vernetzt sind. In dieses Netzwerk sind einzelne Myosinketten eingeschaltet, die eine gleichmäßige Spannung der "Maschen" bewirken. Die Rigidität der subkortikalen Schicht wird durch die Länge der Aktinfilamente und den Vernetzungsgrad bestimmt.

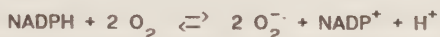
Bindung eines Liganden an den entsprechenden Rezeptor führt zu einer lokalen Erhöhung des intrazellulären Ca^{++} -Spiegels. Dadurch wird Gelsolin aktiviert, das eine Verkürzung der Aktinketten bewirkt (HARTWIG, 1986): die Rigidität des subkortikalen Zytoplasmas sinkt im Bereich der Kontaktaufnahme. Gleichzeitig kommt es durch Ca^{++} -Ionen (über Vermittlung von Calmodulin) zu einer Aktivierung der Myosin-ATPase (VALERIUS, 1984). Durch das Zusammenwirken dieser lokalen Veränderungen der statischen und mechanischen Verhältnisse wird das beschriebene Umfließen des Phagozytosepartikels ermöglicht (WRIGHT and SILVERSTEIN, 1986). Der gesamte Inkorporationsvorgang dauert etwa 1 Minute (COTTIER et al., 1980). Die Energie für den Phagozytoseprozeß wird überwiegend über den Weg der anaeroben Glykolyse bereitgestellt (KLEBANOFF and CLARK, 1978).

2.2.4 Mikrobizidie

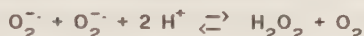
In engem Zusammenhang mit der Phagozytose stehen zwei für die Abwehrfunktionen des Neutrophilen Granulozyten wichtige Phänomene: die Degranulation und eine Aktivierung des aeroben Stoffwechsels ("respiratory burst").

Schon während des Inkorporationsvorganges nehmen mittels des Mikrotubulus-systems primäre und sekundäre Granula Kontakt mit der sich einstülpenden Zellmembran auf. Durch Verschmelzen der umhüllenden Membranen mit Frei-

setzung des Granulainhaltes entsteht das Phagolysosom (KLEBANOFF and CLARK, 1978). Die lokale Aktivierung einer membrangebundenen NADPH-Oxidase ist die Ursache des Ansteigens des granulozytären Sauerstoffverbrauches während der Phagozytose auf das 2 - 15 fache der Ruhewerte (MARKERT and FREI, 1981). Das Enzym katalysiert unter Einschaltung eines Flavoproteins und eines Cytochrom b die Ein-Elektronen-Reduktion von molekularem Sauerstoff (ROSSI et al., 1986):



Der Elektronen-Donor NADPH wird im Hexose-Monophosphat-Shunt regeneriert. Neben der NADPH-Oxidase katalysiert auch eine NADH-Oxidase die Bildung der Superoxidionen (GORDON and KOJ, 1985). Entstandene Superoxidionen können entweder spontan oder unter Vermittlung einer Superoxiddismutase zu Wasserstoffperoxid und molekularem Sauerstoff dismutieren:



Als weitere aktive Sauerstoffspezies entstehen Hydroxylradikale (Haber-Weiß-Reaktion; KLEBANOFF, 1980).

Die mikrobiziden Mechanismen lassen sich in sauerstoffabhängige und -unabhängige unterteilen (BEAMAN and BEAMAN, 1984).

Die im respiratory burst entstandenen Sauerstoffabkömmlinge sind per se nur mäßig toxisch für Mikroorganismen (Peroxidation von Membranlipiden, Oxidation von Nukleinsäuren). In Verbindung mit Halogenen und Myeloperoxidase, die bei der Degranulation in das Phagolysosom ausgeschüttet wurden, bildet vor allem Wasserstoffperoxid hochreaktive Metaboliten (v.a. ClO^-). Diese sind unter anderem durch Spaltung von Peptidbindungen, Dekarboxylierung von Aminosäuren, Bildung von Aldehyden und Chloraminen und durch Halogenierung der Zelloberfläche wirksam (BEAMAN and BEAMAN, 1984, KARNOVSKY and BADWEY, 1986).

Die sauerstoffunabhängigen Mechanismen beruhen auf der Wirkung von Lysozym (Angriff auf die Bakterienwand), von kationischen Proteinen (aus den Granula freigesetzt; Erhöhung der Permeabilität der Bakterienzellmembran) und dem Absinken des vakuolären pH (ELSBACH and WEISS, 1985). Den übrigen durch die Degranulation freigesetzten Enzymen kommt für die Mikrobizidie nur eine geringe Rolle zu; sie sind für die Digestion der abgetöteten Keime notwendig.

2.2.5 Wechselwirkungen

Neutrophile Granulozyten erfüllen im Rahmen des Entzündungsgeschehens nicht nur Funktionen als Phagozyten, sondern treten auf vielfältige Weise mit den Geweben und anderen Abwehrzellen des Wirtsorganismus in Wechselwirkung. Von Neutrophilen Granulozyten abgegebene Faktoren (z.B. Produkte des Arachidonsäuremetabolismus) und durch Einwirkung von Granulaenzymen gebildete Spaltprodukte des Blutgerinnungs-, Komplement- und Kininsystems zählen zu den wichtigsten Mediatoren der Entzündungsreaktion (KARNOVSKY and BOLIS, 1982, MOVAT, 1985). Dabei ist die Gesamtwirkung für den Wirtsorganismus durchaus nicht immer nutzbringend.

Freigesetzte Granulaenzyme (Elastase, Kathepsin G u.a.) spielen z.B. in der Pathogenese der Schocklunge oder des chronischen Lungenemphysems (durch Zerstörung der elastischen Fasern der Alveolarsepten) ebenso wie bei Arthritiden (durch Hyaluronsäurespaltung) eine wichtige Rolle (BADWEY and KARNOVSKY, 1980, BABIOR, 1984). Radikalische Produkte des respiratory burst schädigen nicht nur akut umliegendes Gewebe (WARD, 1987), sondern wirken in chronischen Entzündungsherden über das Auslösen von DNA-Strangbrüchen karzinogen (BABIOR, 1984, SCHRAUFSTÄTTER et al., 1987).

Wurde der kurzlebige Neutrophile Granulozyt lange Zeit als reine Effektorzelle betrachtet und die Rolle der Antigenvermittlung und Kommunikation zwischen verschiedenen Abwehrzellen vorrangig den Mononukleären Zellen zugeschrieben (VAN OSS, 1986), so mehren sich mittlerweile Hinweise, die auf ähnliche Funktionen der Mikrophagen schließen lassen: Modulation der Makrophagenfunktion durch von Granulozyten freigesetzte spezifische Chemotaxine und/oder immobilisierende Faktoren (WRIGHT and GALLIN, 1979, GORDON and KOJ, 1985), Aktivierung von Makrophagen zur Phagozytose (ISHIBASHI and YAMASHITA, 1987), Mitwirkung in der Antigenpräsentation (NAKAYAMA et al, 1982).

2.3 Granulozytenrezeptoren

Für den Neutrophilen Granulozyten als schnell reagierende Abwehrzelle ist ein effektiver Informationsfluß zwischen Extra- und Intrazellulärraum von großer Wichtigkeit. Zellmembranrezeptoren spielen deshalb für die Funktionen des Granulozyten eine bedeutende Rolle.

Auf reifen Neutrophilen Granulozyten lassen sich spezifische Rezeptoren für eine große Anzahl von Chemotaxinen und Opsoninen nachweisen (Übersicht bei SKLAR, 1986). Diese Membranmarker fehlen noch auf den Vorläuferzellen der myeloischen Reihe und werden erst nach und nach auf dem Weg vom Myeloblasten zum segmentkernigen Neutrophilen exprimiert (BARRETT et al., 1981, ROSENBERG et al., 1985). Auf ruhenden Granulozyten sind zwischen 10^4 und 10^6 Rezeptoren jeder einzelnen Spezifität ausgebildet (SNYDERMAN and PIKE, 1984). Anhand unterschiedlicher Rezeptorexpression lassen sich zirkulierende Neutrophile in Subklassen unterteilen (KLEMPNER and GALLIN, 1978, GALLIN, 1984).

Die Bedeutung von Granulozytenrezeptoren für die Adhärenz am Gefäßendothel ist nicht genau bekannt, allerdings begünstigen chemotaktische Faktoren das Anlagern an die Endothelzellen durch eine Veränderung von "Oberflächeneigenschaften" des Granulozyten (HARLAN et al., 1987).

Das Erkennen eines chemotaktischen Gradienten erfordert ein subtiles Zusammenwirken der auf der Zelloberfläche befindlichen entsprechenden Rezeptoren:

Der Neutrophile Granulozyt kann Konzentrationsunterschiede von Chemotaxinen erkennen, die über die Länge des Zelldurchmessers nur 1 % betragen ("spatial sensing") und sich dementsprechend im chemotaktischen Feld orientieren (VALERIUS, 1984). Um eine länger dauernde Ausrichtung zu ermöglichen, müssen ständig wieder freie Rezeptoren zur Ligandenbindung verfügbar sein. Diese werden durch die Degranulation von spezifischen Granula während der Chemotaxis bereitgestellt, in deren Hüllmembran entsprechende Rezeptoren in hoher Dichte vorliegen (TARGOWSKI and NIEMIALTOWSKY, 1987). Die Bindung von Chemotaktika hat auch Einfluß auf die Phagozytose, indem sie die Zahl der Rezeptoren für Opsonine in der Zellmembran oder deren Affinität zu ihren Liganden erhöhen (WALLACH, 1987).

Die "Phagozytose-Rezeptoren" lassen sich in drei verschiedene Klassen einteilen (WRIGHT, 1986):

- a.) Rezeptoren, die nur die Anlagerung von Partikeln vermitteln (z.B. Fibronectin-Rezeptoren)
- b.) Rezeptoren, die sowohl die Anlagerung als auch die Inkorporation und den respiratory burst auslösen (z.B. Fc-Rezeptoren)
- c.) Rezeptoren, die für sich alleine nur eine Anlagerung von Partikeln bewirken, aber in Verbindung mit zusätzlichen Stimuli die Phagozytose fördern (z.B. C3b-Rezeptoren)

Für das Initiieren des Inkorporationsvorganges ist die freie Beweglichkeit der Rezeptoren in der Zellmembran Voraussetzung: nur dann kann der "Zipper-Mechanismus" ungehindert ablaufen.

Eine Obergrenze wird der Phagozytosekapazität des einzelnen Granulozyten entweder durch die begrenzte Anzahl von geeigneten Rezeptoren oder durch die endliche Verfügbarkeit von Zellmembranfläche für die Bildung von phagozytischen Vakuolen gesetzt (WRIGHT and SILVERSTEIN, 1986).

Sowohl über bestimmte Rezeptoren für Chemotaktika, als auch über solche, die die Phagozytose vermitteln, können die Degranulation und der respiratory burst ausgelöst werden. Für die Aktivierung der NADPH-Oxidase durch Bindung von C5a an seinen Rezeptor stellt sich folgender Weg der Signalübertragung dar (SKLAR, 1986, HURST, 1987, VERGHESE et al., 1987): Der Rezeptor-Ligand-Komplex tritt mit einem sogenannten G-Protein in Wechselwirkung. Dieses Membranprotein setzt daraufhin ein GDP-Molekül frei und bindet an dessen Stelle ein GTP. Durch das GTP-G-Protein wird die Phospholipase C aktiviert. Die Phospholipase C spaltet Phosphatidylinositoldiphosphate (Bestandteil der Membranlipide) in Inositoltriphosphat und Diacylglycerole. Inositoltriphosphat löst die Freisetzung von Ca^{++} -Ionen aus intrazellulären Speichern (endoplasmatisches Retikulum) aus. Durch die lokale Konzentrationserhöhung von Kalziumionen wird zytosolische Protein-Kinase C membrangebunden und dann durch Diacylglycerol aktiviert. Diese Proteinkinase phosphoryliert den Flavoproteinanteil der NADPH-Oxidase, wodurch sie zum Elektronentransfer befähigt wird.

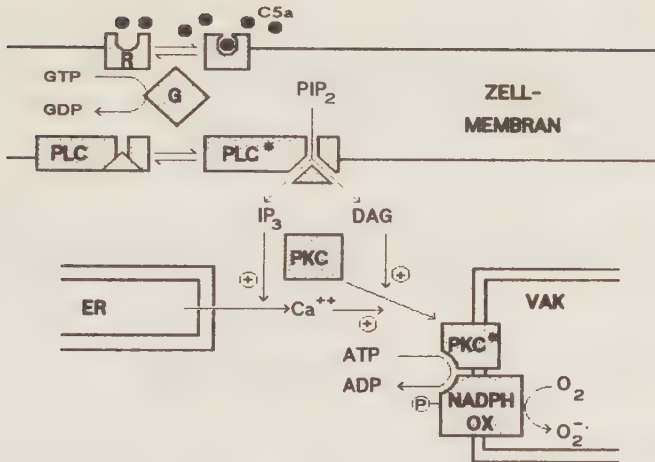


Abb. 2.3: Modell der Signalübertragung am C5a-Rezeptor (nach SKLAR, 1986)
 DAG: Diacylglycerol, ER: Endoplasmatisches Retikulum, G: G-Protein,
 IP₃: Inositoltriphosphat, NADPH OX: NADPH-Oxidase, PIP₂: Phosphatidyl-
 inositoldiphosphat, PKC: Proteinkinase C, PLC: Phospholipase C, R: C5a-
 Rezeptor, VAK: phagozytische Vakuole;
 mit * sind aktivierte Zustände gekennzeichnet

Das Ablaufen der geschilderten Signalkette ist jedoch nicht ausreichend um den respiratory burst auszulösen. Eine weitere Voraussetzung ist z.B. das gleichzeitige Ablaufen der Degranulation, da ca. 90 % des Cytochrom b und 50 % des Flavoproteins in der Membran der spezifischen Granula gebunden sind (BORREGAARD, 1985).

Daneben haben verschiedene Glieder der Signalkette auch Auswirkungen auf andere Funktionen des Granulozyten (freigesetzte Ca⁺⁺-Ionen beeinflussen auch Calmodulin und Gelsolin, die Protein-Kinase C phosphoryliert auch andere Proteine, z.B. Myosin-

ketten) und führen so zu einer komplexen Vernetzung des zellulären Regelwerkes. In diesem System sind zahlreiche positive und negative Rückkopplungskreise geschaltet, die z.B. durch Veränderung der Affinität der Rezeptoren zu ihren Liganden oder über Einflüsse der entstehenden Sauerstoffmetaboliten im Sinne einer Produkt-hemmung wirksam werden (CHEUNG et al., 1983, SNYDERMAN and PIKE, 1984, MEGE et al., 1986).

Daß Stoffe, die Granulozytenfunktionen beeinflussen können, auf dieser Ebene der Signalübertragung eingreifen, ist gut vorstellbar, molekulare Wirkmechanismen sind jedoch noch kaum definiert (FENICHEL and CHIRIGOS, 1984).

2.4 In vitro-Methoden zur Beurteilung von Granulozytenfunktionen

2.4.1 Adhärenz

Zur Messung der Adhäsivität von Neutrophilen Granulozyten bestimmt man in vitro entweder die Haftung

- a) am physiologischen Substrat (Endothelzellen) oder
- b) an künstlichen Oberflächen.

Die Adhärenz an Monolayers von Endothelzellen dürfte den In vivo- Verhältnissen am nächsten kommen. Diese Methode wird für Vergleichsuntersuchungen zur Bewertung der unter b) genannten Techniken herangezogen (MACGREGOR et al., 1978). Die Messung der Adhärenz an künstlichen Oberflächen benutzt entweder Nylonwatte oder Glasperlen als Substrat (SMITH and LUMSDEN, 1983). Das Haften von Granulozyten an beiden Oberflächen stellt einen aktiven, energieabhängigen Prozeß dar (STOSSEL, 1978, RASP et al., 1979).

Nylonwattemethode (MACGREGOR et al., 1974):

Abgewogene Mengen von Nylonwatte werden in Pasteurpipetten auf ein definiertes Volumen gepackt und diese Säulen mit isolierten Granulozyten oder Vollblut beschickt. Durch Vergleich der Zellzahl im Eluat mit der Anzahl aufgetragener Zellen wird die prozentuale Retention ermittelt. Verschiedene Variationen dieser Methodik, die sich vor allem in der Menge der verwendeten Nylonwatte und der Art der Säule unterscheiden, wurden beschrieben (SMITH et al., 1981, SMITH and LUMSDEN, 1983, SEOW et al., 1986).

Glasperlenmethode (LORENTE et al., 1978):

Ein bestimmtes Volumen Vollblut wird in Einmalspritzen unter ständigem Rotieren mit einer Anzahl Glasperlen inkubiert. Die Abnahme der Granulozytenzahl im Eluat, verglichen mit den aufgetragenen Zellen, dient als Maß für die Retention.

2.4.2 Chemotaxis

Zur Beurteilung der Fortbewegung von Phagozyten kommen folgende Methoden zur Anwendung (SMITH and LUMSDEN, 1983):

Mikrokinematographie
Boyden-Kammer-Methode
Migration unter Agarose

Während die Mikrokinematographie fast ausschließlich benutzt wird, um das Verhalten einzelner Zellen zu beobachten, geben die beiden anderen Techniken Auskunft über das Wanderungsverhalten ganzer Zellpopulationen (bzw. Subpopulationen).

Boyden-Kammer-Methode:

Über die Dicke einer Nitrozellulosemembran, die die beiden Hälften der Boyden-Kammer voneinander trennt, wird ein chemotaktischer Gradient aufgebaut. Entgegen diesem Gradienten wandern Granulozyten durch die Mikroporen der Membran. Die Bestimmung der Migrationsrate erfolgt mikroskopisch. Viele verschiedene Arten des Versuchsdesigns und der Auswertung kommen zur Anwendung (KLEBANOFF and CLARK, 1978, SMITH and LUMSDEN, 1983).

Migration unter Agarose:

Unter einer Agar- bzw. Agaroseschicht wandern Phagozyten in Petrischalen entgegen einem chemotaktischen Gradienten, der im Agar aufgebaut wird. Die Quantifizierung der zurückgelegten Strecke erfolgt mit mikrometrischen Methoden. Die Unter-Agarose-Technik läßt gleichzeitig eine Beurteilung der "random migration", der Bewegungsaktivität ohne Einwirkung eines Chemotaxis zu (CUTLER, 1974, NELSON et al., 1975). Zahlreiche Variable im Versuchsaufbau beeinflussen die Ergebnisse dieses Testes (REPO, 1977, BELSHEIM, 1981).

2.4.3 Phagozytose

Zur Messung der Phagozytoserate kommen eine Vielzahl von Tests zur Anwendung (Übersicht bei REIFENBERG, 1987). Die mikroskopische Auswertung von Phagozytosepräparaten wird seit BRANDT (1967) in verschiedensten Variationen angewendet. Ein wesentliches Kriterium für die Bewertung einer Methode zur Messung der Phagozytoserate ist die Fähigkeit zwischen adhärierten und inkorporierten Partikeln zu differenzieren (BESTERMAN and LOW, 1983, SMITH and LUMSDEN, 1983, LEIJH et al., 1986). Um dies zu erreichen wurden folgende Wege eingeschlagen:

Vor der mikroskopischen Auswertung werden nicht inkorporierte Phagozytosepartikel entfernt:

- * Latexpartikel durch Auflösen mit Xylol
- * Staph. aureus durch Auflösen mit Lysostaphin
- * Erythrozyten durch hypotone Lyse (VAN FURTH, 1980)

Die unterschiedliche Anfärbbarkeit inkorporierter und nicht inkorporierter Partikel wird zur Differenzierung ausgenutzt:

- * Anfärbung nicht inkorporierter, hitzeinaktivierter Hefezellen mit Methylenblau (LEHRER and CLINE, 1969)
- * Markierung nicht inkorporierter Mikroorganismen durch spezifische fluoreszeinkonjugierte Antikörper (PAROD and BRAIN, 1986)
- * Quenching der Fluoreszenz nicht inkorporierter, FITC- markierter Phagozytosepartikel durch Zugabe von Kristallviolett (HED, 1977) oder Methylenblau (ODA and MAEDA, 1986)
- * Färbung nicht inkorporierter Hefezellen mit Diaethanol (LEVITZ et al., 1987)

Als Maß für die Phagozytoserate wird bei den mikroskopischen Methoden im allgemeinen die pro Phagozyt aufgenommene Partikelzahl angegeben.

2.4.4 Chemolumineszenz

Zur Bestimmung der mikrobiziden Fähigkeiten von Phagozyten dienen zum einen Techniken, die unmittelbar die Abtötungsrate verschiedener Mikroorganismen messen, zum anderen lassen verschiedene Parameter, die mit der Degranulation und dem respiratory burst in Zusammenhang stehen, entsprechende Rückschlüsse zu (vergleichende Übersicht bei WINTER, 1987).

ALLEN et al. vermuteten 1972 einen Zusammenhang von elektronisch angeregten Stoffwechselmetaboliten des Granulozyten mit dessen Mikrobizidie. Den Nachweis von angeregten Elektronen führten sie über die Messung von Lichtemissionen während des Phagozytoseprozesses. Die ohne Verstärkung meßbare Chemolumineszenz ist sehr schwach und ihre Herkunft nicht völlig geklärt: Die zunächst von Allen als Ursache vermutete Bildung von Singulett-Sauerstoff erscheint als sehr unwahrscheinlich (FOOTE, 1979, FOOTE et al., 1981). Vielmehr sind wohl mehrere andere aktive Sauerstoffspezies (FROMTLING and ABRUZZO, 1985), Produkte des Arachidonsäuremetabolismus (CHEUNG et al., 1983) und Reaktionen bestimmter Chloramine (ZGLICZYNSKI et al., 1985) an der Entstehung der Chemolumineszenz beteiligt.

Um die Messung der Chemolumineszenz zu erleichtern werden verschiedene Verstärkersubstanzen eingesetzt. Luminol (5-Amino- 2,3-dihydro-1,4-phthalazindion) reagiert mit verschiedenen aktiven Sauerstoffspezies unter geeigneten äußeren Bedingungen zu Aminophthalat unter Aussendung von Licht (WHITE et al., 1964).

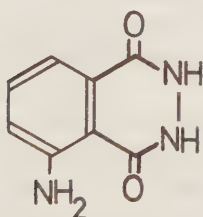


Abb. 2.4.4.1: Luminol

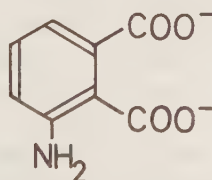


Abb. 2.4.4.2: α-Aminophthalat

Zur Verstärkung der Chemolumineszenz phagozytierender Zellen durch Luminol müssen sowohl Produkte des respiratory burst als auch der Degranulation vorhanden sein (DECHATELET et al., 1982, EDWARDS, 1987). Deshalb erscheint die luminolverstärkte Chemolumineszenz grundsätzlich als Mittel zur Beurteilung der mikrobiziden Fähigkeiten von Granulozyten geeignet.

2.5 Modulation von Granulozytenfunktionen durch echinaceahaltige Präparate

Pflanzliche Präparate werden seit langem als Mittel zur unspezifischen Steigerung der Abwehrkräfte bei Mensch und Tier eingesetzt. Echinaceahaltige Präparate wurden und werden zu diesem Zwecke besonders häufig verwendet (WAGNER, 1985). Während ihre Anwendung zunächst rein empirisch erfolgte, lassen sich ihre Wirkmechanismen inzwischen näher charakterisieren.

Wirkungen echinaceahaltiger Präparate auf die humorale Abwehr:

- * Erhöhte Bakterizidie von Seren behandelter Mäuse gegenüber *Staph. aureus* (BEUSCHER et al., 1977)
- * Die humorale Immunantwort auf humanes Serumalbumin wird beim Huhn verstärkt (WÜRDINGER, 1986)

Wirkungen echinaceahaltiger Präparate auf die zelluläre Abwehr:

- * Erhöhte Phagozytoseaktivität in vivo nach Verabreichung an Maus und Huhn (WAGNER et al., 1986, KLUMPP, 1986)
- * Erhöhte Phagozytoseaktivität von Makrophagen und Granulozyten in vitro nach Verabreichung an Maus und Mensch (BEUSCHER, 1982, WAGNER et al., 1985)
- * Erhöhte Phagozytoseaktivität von Makrophagen und Granulozyten in vitro nach Applikation der Präparate in vitro bei Mensch und Huhn (WAGNER et al., 1986, REIFENBERG, 1987)
- * Erhöhte Aktivität lysosomaler Enzyme bei Makrophagen der Maus (BEUSCHER, 1982)
- * Erhöhte Chemolumineszenzantwort phagozytischer Granulozyten bei Mensch und Kaninchen (WAGNER et al., 1986, ENBERGS und WOESTMANN, 1987)

Eine nähere pharmakologische Eingrenzung der wirksamen Prinzipien pflanzlicher Abwehrstimulanzien bereitet zum einen deshalb Schwierigkeiten, weil die chemische Zusammensetzung der einzelnen Pflanzenaufbereitungen noch kaum bekannt ist, zum anderen weil die verwendeten Präparate häufig nur als Mischpräparate voll wirksam sind (WAGNER, 1986).

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Leukozytenzählung

Die Bestimmung der Gesamt-Leukozytenzahl erfolgt mit Hilfe der Zählkammermethode (Zählkammer nach Neubauer, Verdünnung, Erythrolyse und Färbung mit Türks Lösung¹).

3.2 Differentialblutbild

Das Differentialblutbild wird anhand von Blutausstrichen bestimmt, die entsprechend der Methode nach Pappenheim² gefärbt sind. Es werden jeweils 100 Leukozyten pro Präparat ausgezählt. Auf dieselbe Weise wird die isolierte Leukozytenfraktion auf ihre Zusammensetzung hin untersucht.

3.3 Adhärenztest

Der Adhärenztest erfolgt in Anlehnung an die von LORENTE et al. (1978) beschriebene Methode.

3.3.1 Versuchsaufbau

Glasperlen von 4,0 mm Durchmesser³ werden über Nacht in destilliertem Wasser gewaschen und am nächsten Morgen bei 120°C getrocknet. Jeweils 65 dieser Perlen werden in 5ml-Spritzen abgezählt und im Brutschrank bei 37°C vorgewärmt. Über den Konus werden je Spritze 100 µl der zu untersuchenden Lösung einpipettiert. Auf demselben Weg wird 1 ml vorher durchgemischtes, ungerinnbar gemachtes Blut (von Schlachtschweinen, vgl. 3.5.13) zugegeben. Das Spritzenvolumen wird mit Hilfe des Stempels auf 5 ml eingestellt und der Konus mit einer geeigneten Kunststoffkappe verschlossen.

¹ E. Merck, Darmstadt, Art.Nr.: 9277

² May-Grünwalds Lösung modifiziert, E. Merck, Darmstadt, Art.Nr.: 1424
Giemsas Lösung, E. Merck, Darmstadt, Art.Nr.: 9204

³ Fa. Bender und Hobein, München, Art.Nr.: 9.012404

Sodann läßt man die Spritzen im Brutschrank (37°C) 30 Minuten lang mit 14 U/min um ihre Querachse rotieren. Danach werden die Verschlußkappen abgenommen, die Spritzen auf Reagenzgläser gesetzt und nach Entfernen der Stempel mit je 2 ml PBS-Lösung⁴ behutsam nachgespült. Um die zwischen den Perlen verbleibende Flüssigkeit möglichst vollständig zu gewinnen, wird 2-3 Mal vorsichtig gegen die Spritze geklopft.

Folgende Lösungen werden untersucht (jeweils in Doppelansätzen):

- * Kochsalzlösung 0,9 %ig
- * Influx-Tropfen, entalkoholisiert (Ch 7322), Steigerwald, eingestellt auf einen Echinacosidgehalt von 0,03 µg/ml; der Alkoholgehalt beträgt $2,4 \times 10^{-3} \%$ (v/v)
- * Alkohollösung $2,4 \times 10^{-2} \%$ (v/v)

3.3.2 Auswertung

Sowohl im eingesetzten Blut, als auch in den Eluat werden die Gesamtleukozytenzahl und der Anteil der Neutrophilen Granulozyten bestimmt (vgl. 3.1 und 3.2).

Die prozentuale Retention wird nach folgender Formel bestimmt:

$$\% \text{ Retention} = \frac{\text{PMN in 1 ml Blut} - \text{PMN im Eluat}}{\text{PMN in 1 ml Blut}} \times 100$$

Dabei errechnet sich die Anzahl der PMN⁵ im Eluat aus dessen Volumen und dem Anteil der PMN an den Leukozyten.

⁴ PBS = Phosphate Buffered Saline

⁵ PMN = Polymorphonuclear Leukocyte

3.4 Chemotaxistest

Der Chemotaxistest wird als modifizierte LMAT (leukocyte migration under agarose technique) nach NELSON et al. (1975) durchgeführt.

3.4.1 Agarplatten

400 mg gereinigter Agar⁶ werden in 40 ml bidestilliertem Wasser aufgekocht und im Wasserbad auf 48°C abgekühlt. Sodann werden 5 ml vorgewärmtes, inaktiviertes Fetales Schweineserum (vgl. 3.5.16.1) und 5 ml 10-fach konzentriertes BME-Medium⁷ mit 2,5 mg NaHCO₃/ml dazugegeben.

Je 2,5 ml des Agars werden in Kunststoff-Petrischalen⁸ ausgegossen. Nachdem der Agar bei Zimmertemperatur 30 Minuten abgekühlt ist, wird er über Nacht im Kühlschrank gelagert. Agarplatten werden immer am Tag nach dem Ausgießen verwendet.

3.4.2 Serumaktivierung

10 mg Zymosan⁹ werden in 1 ml 0,9 %iger Kochsalzlösung durch kräftiges Aufschütteln suspendiert. 0,1 ml dieser Lösung werden zu 1 ml frisch aufgetautem Fetalem Schweineserum gegeben und 1 Stunde lang bei 37°C im Wasserbad (60 Schüttelbewegungen/min) inkubiert. Durch Zentrifugieren (1000g, 5 min, 22°C) wird das Zymosan pelletiert und anschließend der Überstand abgehebert. Serum wird für jeden Versuch frisch aktiviert.

⁶ Agar, purified, Difco Laboratories, Detroit, Michigan, Art.Nr.: 0560-02

⁷ Basal Medium Eagle mit Hank's Salzen (10 x) ohne L-Glutamin, ohne NaHCO₃, Biochrom KG, Berlin, Art.Nr.: F 0253

⁸ Petrischalen 35 x 10 mm, Becton Dickinson, Heidelberg, Art.Nr.: 1008

⁹ Sigma Chemicals Co., St. Louis, Art.Nr.: Z-4250

3.4.3 Versuchsaufbau

Granulozyten (Isolation vgl. 3.5.2) werden in RPMI-Medium¹⁰ mit einem Zusatz von 4,5 % inaktiviertem Fetalem Schweineserum suspendiert und auf eine Dichte von $3,75 \times 10^7/\text{ml}$ eingestellt. Je 400 μl der Zellsuspension werden mit 200 μl der zu untersuchenden Lösung im Wasserbad (37°C, 60 Schüttelbewegungen/min) für 30 Minuten vorinkubiert. Folgende Lösungen werden untersucht:

- * Kochsalzlösung 0,9 %ig
- * Influenx-Tropfen, entalkoholisiert (Ch.7322), Steigerwald, eingestellt auf einen Echinacosidgehalt von 0,03 $\mu\text{g}/\text{ml}$; der Alkoholgehalt beträgt $2,4 \times 10^{-3}\%$ (v/v)
- * Alkohollösung $2,4 \times 10^{-2}\%$ (v/v)

Während der Vorinkubationszeit werden in den über Nacht ausgehärteten Agar je 3 kreisrunde Löcher von 3 mm Durchmesser gestanzt. Die Löcher sind linear angeordnet mit einem Zwischenraum von jeweils 3 mm. In das eine der äußeren Löcher werden jeweils 10 μl aktiviertes Serum gegeben, in das andere ein Aliquot RPMI-Medium. Nach Ablauf der Vorinkubationszeit werden in das mittlere Loch jeweils 10 μl der entsprechenden Zellsuspension pipettiert. Die Platten werden in einer feuchten Kammer für 2 Stunden bei 37°C bebrütet.

Danach wird der Agar für je 30 Minuten mit getrocknetem Methanol und anschließend mit 20 %iger Formaldehydlösung bedeckt. Sodann wird die Agarschicht vorsichtig entfernt. Nachdem die Platten getrocknet sind, werden die anhaftenden Zellen 4 Minuten lang mit May-Grünwalds Lösung gefärbt.

Es werden pro Testlösung jeweils 3 Parallelansätze untersucht.

3.4.4 Auswertung

Die gefärbten Präparate werden bei Lupenvergrößerung (Objektiv 1:1,6) des Mikroskops¹¹ mit Hilfe einer Fernsehkamera auf einen Bildschirm¹² projiziert

¹⁰ RPMI 1640 ohne Glutamin, mit 2g NaHCO_3/l , Flow Lab., Irvine, Art.Nr.: 12-602-54

¹¹ Leitz Laborlux K, Ernst Leitz, Wetzlar

¹² Panasonic TV-Camera WV-1400/G; Panasonic Screen WV-5350

(Gesamtvergrößerung ca. 18,3-fach). Mit einer Schablone in Form von konzentrischen Kreisen auf einer Folie wird der Abstand der Granulozytenfront vom Rand des mittleren Loches bestimmt. Die jeweils am weitesten gewanderten ca. 10 Granulozyten werden diskriminiert.

Dabei wird die Strecke, die die Zellen in Richtung des Loches, das Medium enthält, durchwandern, als Maß für die spontane Migration (Strecke A), diejenige Strecke, die sie auf das aktivierte Serum zu wandern, als Maß für die Chemotaxis (Strecke B) betrachtet.

Das Verhältnismaß dieser beider Strecken wird als chemotaktischer Index bezeichnet:

$$\text{Chemotakt. Index} = \frac{\text{Strecke A}}{\text{Strecke B}}$$

3.5 Phagozytostest

3.5.1 Testprinzip

Das Phagozytoseverhalten von Granulozyten wird in einem in vitro-Modell untersucht. Isolierte Neutrophile Granulozyten werden mit opsonisierten Hefezellen inkubiert. Nach einer definierten Zeitspanne wird der Ingestionsprozeß gestoppt und die Phagozytoserate mikroskopisch bestimmt. Die sichere Erkennung von inkorporierten Hefezellen wird durch eine fluoreszenzoptische Technik ermöglicht, die Acridinorange zur Färbung des Präparates und Methylenblau zum Quenching der Fluoreszenz nicht inkorporierter Hefezellen benutzt.

Eine zweite, lichtmikroskopische Methode für die Differenzierung zwischen adhären und inkorporierten Hefezellen wird vorgestellt.

Die Beeinflussung der Phagozytoserate durch Influx-Tropfen wird durch Vorinkubation der zu untersuchenden Granulozyten mit dem Präparat bestimmt. Dabei wird im Konzentrationsvorversuch eine geeignete Kombination von Vorinkubationszeit und Verdünnungsstufe ermittelt, im Substanzendversuch das Influxpräparat sowie die Echinaceakomponente gegen eine Kochsalz- und Alkoholkontrolle ausgetestet.

Die Wirkung von Influx-Injektionslösung wird durch Verabreichung an Läufer-schweine mit anschließendem Phagozytostest bestimmt.

3.5.2 Granulozytenisolation

Für alle Arbeitsschritte werden silikonisierte Glaswaren verwendet. 15 ml Heparinblut werden 1:2 mit PBS verdünnt und 15 Minuten bei 22°C und 1000g zentrifugiert. Der verdünnte Plasmaüberstand, der die mononukleären Zellen enthaltende buffy coat und die oberste PRC-Schicht¹³ werden mit einer Pasteurpipette vorsichtig abgehebert und verworfen. Aus den verbleibenden PRC werden 2 Portionen von jeweils 2 ml entnommen und mit je 2 ml PBS vermischt. Durch Zugabe von je 12 ml kalten, destillierten Wassers werden Erythrozyten lysiert. Nach 45 Sekunden wird durch Zugabe von je 6 ml 2,7 %iger NaCl-Lösung und durch gründliches Mischen wieder Isotonie hergestellt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (125g, 10 min, 22°C) wird der Überstand bis auf 2 ml über dem Pellet abgenommen, letzteres nach Zugabe von 2 ml PBS aufgeschwemmt und die Erythrolyse in der oben beschriebenen Weise wiederholt. Die nun verbleibenden Zellpellets werden gemeinsam in RPMI aufgenommen und auf 3×10^6 Zellen/ml eingestellt (Verdünnung mit RPMI).

Die Vitalität der isolierten Zellcharge wird im Trypanblauausschlußtest durch Auszählen von 100 Leukozyten bestimmt.

3.5.3 Hefezellsuspension

Handelsübliche Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*) wird in 0,9 %iger NaCl-Lösung aufgeschwemmt und im Wasserbad 30 Minuten gekocht. Nach Abkühlen wird die Suspension zweimal durch sterile Gaze filtriert und die Hefezellzahl anschließend mit 0,9 %iger NaCl-Lösung auf 3×10^7 /ml eingestellt. 5ml-Portionen dieser Suspension werden bei -20°C in Polystyrolröhrchen eingefroren. Alle Versuche werden mit ein- und derselben Hefepräparation durchgeführt.

3.5.4 Schweineserumpool

Blut von 5 Schlachtschweinen wird ohne Zusätze 1 Stunde lang bei 37°C inkubiert und dann bei Kühlschranktemperatur über Nacht gelagert. Das ausgetretene Serum wird abgehebert, zentrifugiert (1000g, 10 min, 20°C) und die Überstände gepoolt. 1ml-Portionen des Schweineserumpools werden eingefroren (-20°C).

¹³ PRC = Packed Red Cells

3.5.5 Fetaler Schweineserumpool

3 neugeborene Ferkel werden vor dem ersten Saugen nach mechanischer Betäubung entblutet. Das aufgefangene Blut wird ohne Zusätze bei 37°C inkubiert und dann über Nacht bei Kühlschranktemperatur gelagert. Das ausgetretene Serum wird abgehebert, zentrifugiert (1000g, 10 min, 20°C) und die Überstände gepoolt. 1ml-Portionen des Fetalen Serumpools werden eingefroren (-20°C).

3.5.6 Opsonisierung

Zu 2,5 ml aufgetauter Hefesuspension wird 1 ml aufgetautes Serum gegeben und der durchmischte Ansatz für 60 Minuten im Wasserbad inkubiert (37°C, 30 Schüttelbewegungen/min). Nach Zugabe von 5 ml PBS und gründlichem Durchmischen werden die opsonisierten Hefezellen abzentrifugiert (1000g, 5 min, 20°C) und erneut in einer Dichte von 3×10^7 /ml, jedoch in RPMI suspendiert.

3.5.7 Vorinkubation

300 µl Granulozytensuspension werden im Wasserbad (37°C, 30 Schüttelbewegungen/min) mit 300 µl der zu untersuchenden Lösung in Polystyrolröhrchen¹⁴ vorinkubiert.

3.5.8 Phagozytoseansatz

Nach Ablauf der Vorinkubationszeit wird durch Zugabe von 300 µl der opsonisierten Hefezellsuspension und gründliches Durchmischen der Phagozytoseprozeß gestartet. Die Ansätze werden 20 Minuten bei 37°C im Wasserbad (60 Schüttelbewegungen/min) inkubiert.

3.5.9 Stoppen der Phagozytose

Durch Zugabe von je 100 µl EDTA-Lösung¹⁵ (100 mmol/l in 0,9 %iger NaCl-Lösung)

¹⁴ Fa. Greiner, Nürtingen, 17,0 x 100 mm (14 ml), Art.Nr.: 187103

¹⁵ Titriplex III, E. Merck, Darmstadt, Art.Nr.: 8418

und Verbringen der Proben ins Eisbad wird nach Verstreichen der Inkubationszeit der Inkorporationsvorgang abgestoppt.

3.5.10 Randomisierung der Proben

Den Probenröhrchen werden Zufallszahlen als Nummern zugeordnet, um eine "blinde" Auszählung zu gewährleisten.

3.5.11 Färbung

1 ml Acridinorangelösung¹⁶ (0,01 % in Sörensens buffer, pH 7,70) wird zu dem Phagozytoseansatz gegeben und dieser 3 Minuten bei 30°C gefärbt.

3.5.12 Herstellung der Präparate

Nach gründlichem Aufschütteln des gefärbten Ansatzes werden 2 Tropfen von je 5 µl auf einen Objektträger verbracht. Einer davon wird mit 5 µl einer 0,2 %igen Methylenblaulösung¹⁷ vermischt und beide mit je einem Deckglas bedeckt.

3.5.13 Auswertung

Die Auszählung erfolgt unter dem Fluoreszenzmikroskop¹⁸ bei 400-facher Vergrößerung.

Im nicht mit Methylenblau gequenchten Präparateteil erfolgt die Lebend-Tot-Zählung der Leukozyten.

Im zweiten Präparateteil werden 100 lebende Leukozyten ausgezählt und die Anzahl an jeweils aufgenommenen Hefezellen bestimmt.

Der Phagozytoseindex wird nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{Summe der von 100 Granulozyten aufgenommenen Hefezellen}}{100}$$

¹⁶ Serva, Heidelberg, Art.Nr.: 46005

¹⁷ E. Merck, Darmstadt, Art.Nr.: 1283

¹⁸ Leitz Laborlux K, Ernst Leitz, Wetzlar

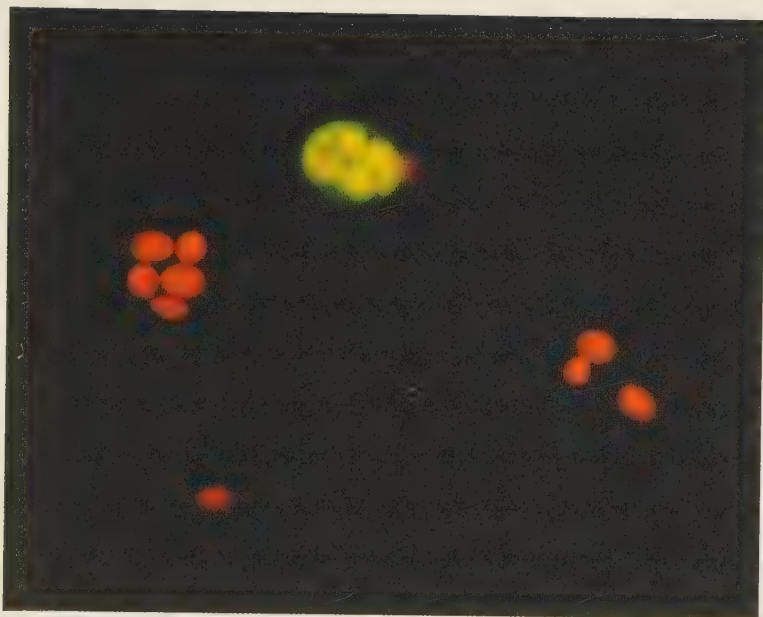


Abb. 3.5.13.1: Ungequenchtes Präparat: Ein Phagozyt mit 4 inkorporierten Hefezellen, sowie mehrere frei liegende Hefezellen

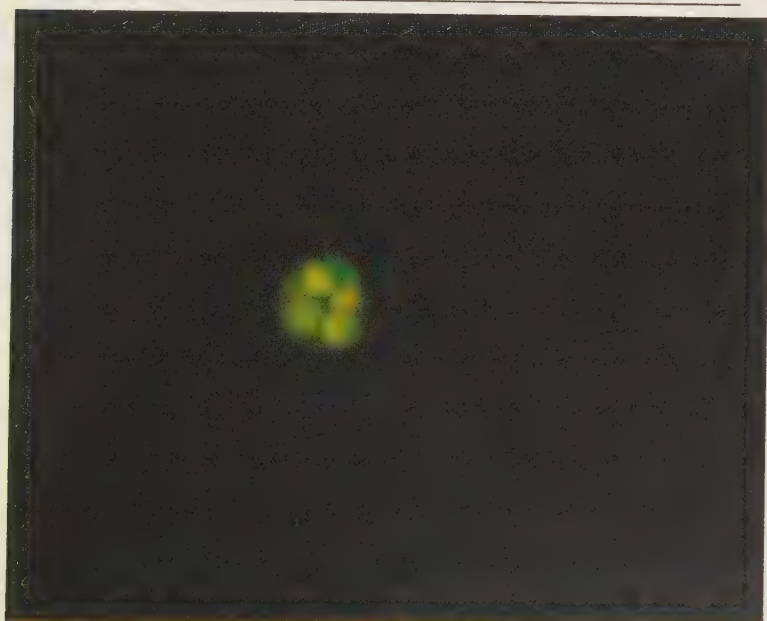


Abb. 3.5.13.2: Methylenblau-gequenchtes Präparat: Ein Phagozyt mit 4 inkorporierten Hefezellen

3.5.14 Stimulation in vitro, Versuchsaufbau

Granulozyten werden aus Blut von Schlachtschweinen isoliert. Es werden Tiere ausgewählt, die einheitlich ca. 100 kg schwer sind und adspektorisch keinerlei Anzeichen von floriden oder überstandenen Krankheiten aufweisen. Anlässlich der Schlachtung (Betäubung: Elektroschock) aufgefangenes Blut wird durch Zugabe von Heparinlösung¹⁹ (500 I.E./ml, Verdünnung mit RPMI-Medium, davon 1 ml mit 19 ml Blut vermischt) ungerinnbar gemacht. Das Blut wird bis zum Beginn der Zellisolation auf Eis gelagert (ca. 25 min).

3.5.14.1 Testsubstanzen

Für die in vitro-Versuche finden folgende Präparationen Verwendung:

- * Echinacea Ø (Charge 6468 B 23), Steigerwald:

Die Urtinktur aus Echinacea angustifolia enthält 0,205 mg Echinacosid je Milliliter einer 64 %igen (v/v) Alkohollösung.

- * Echinacea Ø , entalkoholisiert (Charge 6468 B 23), Steigerwald:

Der Alkohol der Urtinktur ist, bis auf einen technologisch unvermeidlichen Rest, durch destilliertes Wasser ersetzt. Der Echinacosidgehalt beträgt 0,195 mg je Milliliter einer 14,7 %igen (v/v) Alkohollösung.

- * Influx-Tropfen (Charge 7322), Steigerwald:

100 ml enthalten:

Aconitum	D4	15 ml
Apis mellifica	D3	10 ml
Echinacea angustifolia	Ø	30 ml
Lachesis muta	D6	30 ml

Das vorliegende Präparat enthält 0,0565 mg Echinacosid je Milliliter einer 46,8 %igen (v/v) Alkohollösung.

¹⁹ Liquemin 5000, Hoffmann-La Roche AG, Reg.Nr.: 47196

- * Influx-Tropfen, entalkoholisiert (Charge 7322), Steigerwald:

Bis auf einen technologisch unvermeidlichen Rest ist der Alkohol der Influx-Tropfen durch destilliertes Wasser ersetzt. Der Echinacosidgehalt beträgt 0,039 mg je Milliliter einer 2,4 %igen (v/v) Alkohollösung.

Der Alkoholentzug sowie die Analyse der Testlösungen erfolgten durch die Herstellerfirma.

3.5.14.2 Konzentrationsvorversuch

Für 4 verschiedene Vorinkubationszeiten (10, 20, 30, 40 Minuten) wird die Beeinflussung der Phagozytose durch alkoholisch gelöste Influxtropfen bestimmt. Dabei werden Influx-Tropfen der Charge 7322 eingesetzt. Mit 0,9 %iger NaCl-Lösung wird das Präparat soweit verdünnt, daß die zu untersuchenden Inkubationsansätze 10^{-7} - 10^0 µg Echinacosid/ml enthalten (8 Verdünnungsstufen in 10er-Schritten). Dadurch ergeben sich in den Inkubationsansätzen Alkoholkonzentrationen von 8×10^{-8} - 8×10^{-1} % (v/v). Pro Schwein werden 4 Verdünnungsstufen bei jeweils 3 Vorinkubationszeiten untersucht. Außerdem werden je 2 Ansätze ausgezählt, bei denen die Testsubstanz durch 0,9 %ige Kochsalzlösung ersetzt wird. Pro Schwein sind also 14 Ansätze zu untersuchen. Im Konzentrationsvorversuch wird Hefe mit Schweineserumpool opsonisiert.

3.5.14.3 Substanzendversuch

Bei einer Vorinkubationszeit von 30 Minuten wird für 5 verschiedene Testlösungen die Beeinflussung der Phagozytoserate bestimmt:

- * Alkoholkontrolle
- * Echinacea-Lösung, alkoholisch
- * Echinacea-Lösung, entalkoholisiert
- * Influx-Tropfen, alkoholisch
- * Influx-Tropfen, entalkoholisiert

Echinacea-haltige Präparationen sind einheitlich auf 0,01 µg Echinacosid je Milliliter Inkubationsansatz eingestellt. Der Äthanolgehalt der alkoholischen Aufbereitungen und der Alkoholkontrolle beträgt $8 \times 10^{-3} \%$ (v/v) im Inkubationsansatz, der der entalkoholisierten Präparate $8 \times 10^{-4} \%$ (v/v).

Je Schwein werden die 5 Lösungen in je 2 Ansätzen untersucht, wobei das eine Mal die Hefe durch Schweineserumpool, das andere Mal durch Fetales Schweineserum opsonisiert ist. Außerdem werden dementsprechend 2 Mal 2 Ansätze ausgezählt, in denen die Testlösung durch ein Aliquot 0,9 %iger Kochsalzlösung ersetzt ist.

3.5.15 Stimulation in vivo, Versuchsaufbau

3.5.15.1 Tiermaterial

16 Schweine, Kreuzungsprodukte Deutsche Landrasse x Pietrain, im Alter von etwa 4,5 Monaten werden untersucht. Das durchschnittliche Gewicht 2 Tage vor Versuchsbeginn beträgt 69,1 kg (SD = 4,3). Die Tiere werden in Einzelboxen auf Betonboden gehalten. Während der Versuchsdauer werden ein mehliges Alleinfuttermittel für Schweine sowie Wasser ad libitum angeboten.

3.5.15.2 Testsubstanz

Es wird Influenza-Injektionslösung der Charge 712309, Steigerwald eingesetzt. 1 Ampulle mit 2 ml Injektionslösung enthält:

Echinacea angustifolia	D 3	400,0 mg
Eupatorium perfoliatum	D 3	200,0 mg
Gelsemium sempervirens	D 3	200,0 mg
Lachesis muta	D10	300,0 mg

3.5.15.3 Zeitplan der Injektionen und Blutentnahmen

Die Schweine werden zufällig in 2 Gruppen (Gruppe A: Schwein 1-8, Gruppe B: Schwein 9-16) von je 8 Tieren eingeteilt. An 6 aufeinanderfolgenden Tagen erhalten die Tiere jeweils morgens eine Injektion in die Nackenmuskulatur:

Gruppe A: 2 ml einer 0,9%igen NaCl-Lösung

Gruppe B: 2 ml Influtex-Injektionslösung

Von jedem Schwein wird zur Bestimmung der Phagozytoserate insgesamt dreimal Blut entnommen. Dabei werden durch Punktion der Vena cava cranialis bzw. der Vena jugularis 19 ml Blut gewonnen und mit 1 ml Heparinlösung (500 I.E./ml) vermischt. Das ungerinnbar gemachte Blut wird bis zum Beginn der Zellisolation auf Eis gelagert (ca. 30 min). Für die Injektionen und Blutentnahmen werden sterile Einmalwaren verwendet.

Es wird folgender Zeitplan eingehalten:

Tag 1: Blutproben Schwein 1, 2, 3, 4, 9, 10, 11, 12

Injektion Schwein 1, 2, 3, 4, 9, 10, 11, 12

Tag 2: Blutproben Schwein 5, 6, 7, 8, 13, 14, 15, 16

Injektion Schwein 1 - 16

Tag 3: Blutproben Schwein 1, 2, 3, 4, 9, 10, 11, 12

Injektion Schwein 1 - 16

Tag 4: Blutproben Schwein 5, 6, 7, 8, 13, 14, 15, 16

Injektion Schwein 1 - 16

Tag 5: Injektion Schwein 1 - 16

Tag 6: Injektion Schwein 1 - 16

Tag 7: Injektion Schwein 5, 6, 7, 8, 13, 14, 15, 16

Tag 8: Blutproben Schwein 1, 2, 3, 4, 9, 10, 11, 12

Tag 9: Blutproben Schwein 5, 6, 7, 8, 13, 14, 15, 16

3.5.15.4 Parallelsätze

Je Blutprobe werden 3 Inkubationsansätze ausgewertet. Die Hefe wird mit Schweineserumpool opsonisiert. Die Vorinkubationszeit beträgt 30 Minuten. Dabei wird anstelle einer Testsubstanz ein Aliquot 0,9 %iger Kochsalzlösung zu der Zellsuspension gegeben.

3.5.16 Serumeinfluß

3.5.16.1 Inaktivierung

Komplementinaktivierung erfolgt durch Erhitzen des Serumpools auf 56°C im Schüttelbad für 30 Minuten.

3.5.16.2 Versuchsaufbau

Aus Blut von Schlachtschweinen isolierte Granulozyten werden in folgenden Ansätzen untersucht:

Vorinkubationszeit: 30 Minuten, anstelle von Testsubstanz wird 0,9 %ige NaCl-Lösung zugegeben.

- * Hefe nicht opsonisiert
- * Hefe opsonisiert mit Schweineserumpool
- * Hefe opsonisiert mit Fetalem Schweineserumpool
- * Hefe opsonisiert mit inaktiviertem Schweineserumpool
- * Hefe opsonisiert mit inaktiviertem Fetalem Schweineserumpool

Außerdem wird für mit Schweineserumpool bzw. mit Fetalem Schweineserumpool opsonisierte Hefe je ein Ansatz untersucht, der mit einer Alkohollösung vorinkubiert wird, die im Inkubationsansatz eine Alkoholkonzentration von $8 \times 10^{-4} \%$ (v/v) ergibt.

3.5.17 Färbemethodik Trypanblau/Eosin

3.5.17.1 Vorfärbung Hefe

5 ml aufgetaute Hefesuspension werden bei 1500g 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 2 ml einer 1 %igen Trypanblaulösung²⁰ resuspendiert. Nach Verlauf von 5 Minuten werden 10 ml einer 0,9 %igen NaCl-Lösung zugegeben, gründlich aufgeschüttelt und für 5 Minuten bei 1500g zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wird der Waschschrift noch zweimal unter denselben Bedingungen wiederholt und anschließend die Hefezelldichte wieder auf 3×10^7 /ml eingestellt.

3.5.17.2 Herstellung der Präparate

Von Inkubationsansätzen, bei denen mit Trypanblau vorgefärbte Hefe als Phagozytosepartikel angeboten wird, werden nach Verstreichen der Inkubationszeit 5 μ l auf einen Objektträger pipettiert und dieser Tropfen mit 5 μ l einer 1 %igen Eosinlösung²¹ vermischt.

²⁰ Serva, Heidelberg, Art.Nr.: 37252

²¹ Sigma Chemicals Co., St. Louis, Art.Nr.: E-6002

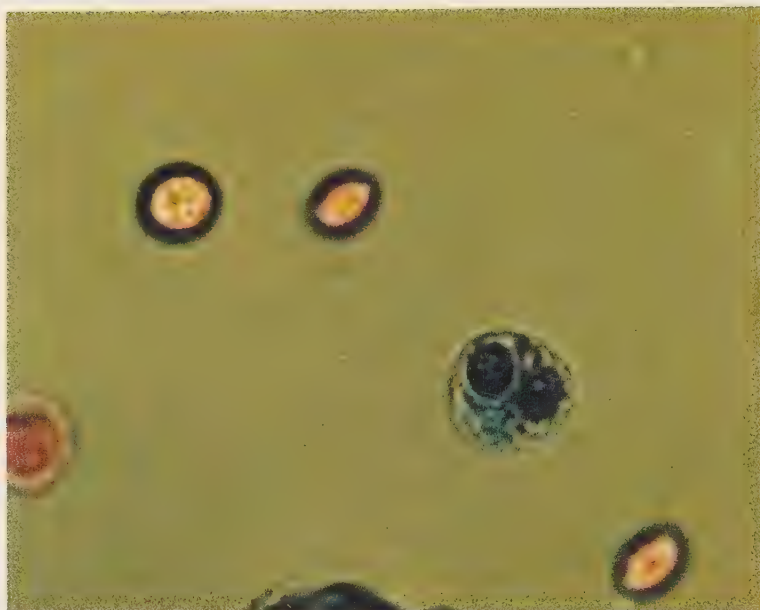


Abb. 3.5.17.1: Präparat mit nicht vorgefärbter Hefe: Phagozyt mit mehreren inkorporierten Hefezellen



Abb. 3.5.17.2: Präparat mit vorgefärbter Hefe: Phagozyt mit 2 inkorporierten Hefezellen, daneben freie Hefezellen, ein toter Leukozyt

3.6 Chemolumineszenztest

Der Chemolumineszenztest wird in Ahnlehnung an die von WINTER (1987) beschriebene Form durchgeführt.

3.6.1 Opsonisierung Zymosan

20 mg Zymosan (vgl. 3.4.2) werden in 2 ml RPMI-Medium durch kräftiges Aufschütteln suspendiert, mit 2 ml Schweineserumpool vermischt und im Wasserbad bei 37°C für 30 Minuten inkubiert (60 Schüttelbewegungen/Minute). Nach Zugabe von 5 ml PBS-Lösung und Durchmischen wird die Suspension bei 1500g für 10 Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in einem Endvolumen von 2 ml RPMI-Medium resuspendiert. Opsonisiertes Zymosan wird täglich frisch hergestellt.

3.6.2 Luminollösung

1,77 mg Luminol²² werden in 1 ml DMSO²³ gelöst und bei 4°C gelagert. Vor Gebrauch werden jeweils 100 µl der Stammlösung mit 900 µl 0,9 %iger NaCl-Lösung verdünnt.

3.6.3 Versuchsaufbau

Die Messung der Chemolumineszenz erfolgt in einem 6-Kanal-Zähler²⁴. In Meßküvetten (12mm x 47mm) werden einpipettiert:

- 300 µl Zellsuspension (1×10^6 Zellen/ml RPMI, Zellisolation vgl. 3.5.1)
- 200 µl Testlösung
- 20 µl Luminol (10^{-3} mol/l)

²² LKB, Gräfelfing, Art.Nr.: 3-507

²³ DMSO = Dimethylsulfoxid

²⁴ Biolumat LB 9505, Fa. Berthold, Wildbad

Nach kurzem Durchmischen werden die Küvetten in die Meßkammern verbracht (37°C) und der Meßvorgang gestartet. Nach Ablauf von 30 Minuten werden jeweils 150 µl opsonisiertes Zymosan zugegeben, der Ansatz aufgeschüttelt und durch Einzelstart der Kanäle eine zweite Meßperiode von 30 Minuten eingeleitet.

Folgende Lösungen werden untersucht:

- * InflueX-Tropfen, entalkoholisiert, eingestellt auf einen Echinacosidgehalt von 0,03 g/ml. Der Alkoholgehalt der Lösung beträgt $2,4 \times 10^{-3} \%$ (v/v).
- * Echinacea 0, entalkoholisiert, eingestellt auf einen Echinacosidgehalt von 0,03 µg/ml. Der Alkoholgehalt der Lösung beträgt $2,4 \times 10^{-3} \%$ (v/v)
- * Alkohollösung $2,4 \times 10^{-3} \%$ (v/v)
- * Alkohollösung $2,4 \times 10^{-3} \%$ (v/v)

Je Meßreihe werden zwei Proben gemessen, bei denen die Testlösung durch ein Aliquot 0,9 %iger NaCl-Lösung ersetzt ist. Die Verteilung der Proben auf die Meßkanäle erfolgt nach dem Zufallsprinzip.

3.6.4 Auswertung

Mit Hilfe eines geeigneten Computerprogrammes²⁵ werden die gemessenen Werte grafisch dargestellt und die gezählten Impulse je Kanal über den Zeitraum von 30 Minuten (unstimulierte Zellen) bzw. 20 Minuten (stimulierte Zellen) integriert.

3.7 Statistik

Es werden Mittelwerte ($\bar{x}$) der gemessenen Daten mit den dazugehörigen Standardabweichungen (SD) angegeben. Vergleiche von Meßreihen erfolgen mit parameterfreien Methoden. Dabei kommen der Vorzeichenrangtest von Wilcoxon (abhängige Stichproben) und der U-Test nach Mann-Whitney (unabhängige Stichproben) zur Anwendung. Abhängigkeit zwischen verschiedenen Merkmalen wird mit Hilfe des Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman überprüft (SIEGEL, 1976).

²⁵ "chemoluminescence-data-reduction", Version 2.2, Berthold, Wildbad

4 ERGEBNISSE

4.1 Leukozytenzählung

Insgesamt wurde die Anzahl der Leukozyten im Blut von 45 Schlachtschweinen bestimmt (vgl. Tab. 8.1, 8.2.1, 8.3.1, 8.3.10, 8.4.1). Die durchschnittliche Gesamt-leukozytenzahl (nach Korrektur der Verdünnung durch den Gerinnungshemmer) betrug: $17,0 \times 10^6/\text{ml}$ ($\text{SD} = 3,5 \times 10^6$).

4.2 Differentialblutbild

Die Leukozytenfraktion im Blut der untersuchten 45 Schlachtschweine setzte sich folgendermaßen zusammen (vgl. Tab. 8.1, 8.2.1, 8.3.1, 8.3.10, 8.4.1):

Neutrophile Granulozyten	61,0 % ($\text{SD} = 7,3$)
Eosinophile Granulozyten	1,0 % ($\text{SD} = 1,0$)
Basophile Granulozyten	0,1 % ($\text{SD} = 0,3$)
Monozyten	2,0 % ($\text{SD} = 1,6$)
Lymphozyten	35,7 % ($\text{SD} = 7,6$)

4.3 Adhärenztest

Blut von 9 Schweinen wurde mit Hilfe des Adhärenztestes (Glasperlenmethode, LORENTE, 1978) untersucht.

Es wurde ein mittleres Eluatvolumen von 2,7 ml gemessen. Folgende Retentionen der Neutrophilen Granulozyten wurden für die 3 untersuchten Lösungen errechnet (ergab sich rechnerisch ein negativer Wert für die Retention, so wurde als prozentuale Retention Null eingesetzt):

	Ansatz 1	Ansatz 2	Mittel
Schwein 1	29	19	24
Schwein 2	24	26	25
Schwein 3	16	24	20
Schwein 4	27	41	34
Schwein 5	37	37	37
Schwein 6	18	34	26
Schwein 7	12	24	18
Schwein 8	23	17	20
Schwein 9	26	34	30

Tab. 4.3.1: Prozentuale Retention der Neutrophilen Granulozyten bei Zugabe von 100 µl 0,9 %iger Kochsalzlösung

	Ansatz 1	Ansatz 2	Mittel
Schwein 1	9	9	9
Schwein 2	6	17	11
Schwein 3	0	11	6
Schwein 4	11	22	16
Schwein 5	26	13	19
Schwein 6	0	0	0
Schwein 7	7	8	7
Schwein 8	0	11	5
Schwein 9	21	11	16

Tab. 4.3.2: Prozentuale Retention der Neutrophilen Granulozyten bei Zugabe von 100 µl einer $2,4 \times 10^{-2}$ %igen (v/v) Äthanollösung

	Ansatz 1	Ansatz 2	Mittel
Schwein 1	37	28	33
Schwein 2	36	35	35
Schwein 3	48	54	51
Schwein 4	50	44	47
Schwein 5	46	45	46
Schwein 6	38	43	41
Schwein 7	44	40	42
Schwein 8	39	38	39
Schwein 9	43	45	44

Tab. 4.3.3: Prozentuale Retention der Neutrophilen Granulozyten bei Zugabe von 100 µl Influx-Tropfen, entalkoholisiert (Ch. 7322), Steigerwald, eingestellt auf einen Echinacosidgehalt von 0,03 µg/ml

Die folgende Abbildung fasst diese Ergebnisse zusammen:

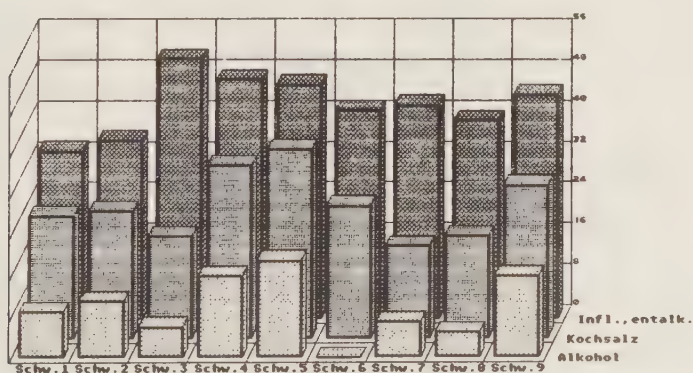


Abb. 4.3.1: Prozentuale Retention der PMN bei Zugabe von 3 verschiedenen Testlösungen

Damit ergaben sich für die untersuchten Lösungen folgende mittlere Retentionen:

NaCl-Lösung 0,9 %	26,0 % (SD = 6,5)
Alkohollösung $2,4 \times 10^{-2}\%$ (v/v)	9,9 % (SD = 6,2)
Influx-Tropfen (0,03 µg Ech/ml)	42,0 % (SD = 5,8)

Die Retention der Granulozyten wurde durch die Alkoholzugabe, verglichen mit der Kochsalzkontrolle, um 63,8 % (SD = 16,4) verringert.

Die Nullhypothese der Gleichheit der Mittelwerte beider Meßreihen muß bei einer vorgegebenen Irrtumswahrscheinlichkeit von 1 % verworfen werden.

Die Zugabe von Influx-Tropfen, entalkoholisiert, eingestellt auf einen Echinacosidgehalt von 0,03 µg/ml erhöhte die Retention um 69,8 % (SD = 46,8).

Die Nullhypothese der Gleichheit der Mittelwerte beider Meßreihen muß bei einer vorgegebenen Irrtumswahrscheinlichkeit von 1 % verworfen werden.

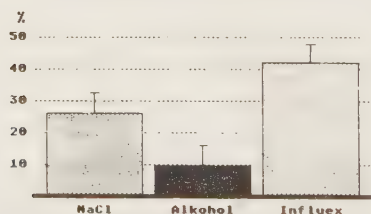


Abb. 4.3.2: Mittlere Retentionen der PMN bei Zugabe von 3 verschiedenen Testlösungen

4.4 Chemotaxistest

Im Chemotaxistest (NELSON, 1978) wurden Zellen von 9 Schweinen in je 3 Parallelansätzen untersucht.

Spontane Migration (vgl. Tab. 8.2.2):

Für die spontane Migration wurden im Mittel folgende durchwanderte Strecken gemessen (angegeben sind die auf dem Bildschirm abgemessenen Strecken):

Nach Vorinkubation mit

NaCl-Lösung, 0,9 %ig	5,07 cm (SD=0,53)
Alkohollösung $2,4 \times 10^{-2}\%$ (v/v)	5,11 cm (SD=0,82)
Influx-Tropfen (0,03 µg Ech/ml)	5,26 cm (SD=0,86)

Die Zunahme der spontanen Migration um durchschnittlich 1,7 % (SD = 5,9) bei Vorinkubation mit der Alkohollösung bzw. um 3,3 % (SD = 9,0) bei Zugabe von Influx-Tropfen im Vergleich zur Kochsalzkontrolle ist auf dem 5%-Niveau nicht signifikant.

Chemotaxis (vgl. Tab. 8.2.3):

Folgende Strecken wurden im Durchschnitt für die chemotaktisch stimulierte Wanderung bestimmt (auf dem Bildschirm abgemessene Strecken):

Nach Vorinkubation mit

NaCl-Lösung, 0,9 %ig	5,80 cm (SD=0,62)
Alkohollösung $2,4 \times 10^{-2}\%$ (v/v)	5,22 cm (SD=0,86)
Influx-Tropfen (0,03 µg Ech/ml)	6,33 cm (SD=0,96)

Die Verkürzung der durchwanderten Strecke um 10,3 % (SD = 6,2) nach Vorinkubation mit Alkohol ist signifikant ($p < 0,01$).

Die Zunahme der mittleren Wandergeschwindigkeit um 9,0 % (SD = 7,3) nach Vorinkubation mit Influx-Tropfen ist signifikant ($p < 0,05$).

Chemotaktischer Index:

Der chemotaktische Index berechnete sich für die verschiedenen Testansätze zu folgenden Werten:

NaCl-Lösung, 0,9 %ig	1,15 (SD = 0,05)
Alkohollösung $2,4 \times 10^{-2}\%$ (v/v)	1,02 (SD = 0,02)
Influx-Tropfen (0,03 µg Ech/ml)	1,24 (SD = 0,08)

Die Abnahme des chemotaktischen Index um 10,9 % (SD = 4,66) nach Vorinkubation mit Alkohollösung bzw. die Zunahme um 7,9 % (SD = 8,8) nach Vorinkubation mit Influx-Tropfen sind signifikant (Alkohol: $p < 0,01$; Influx: $p < 0,05$).

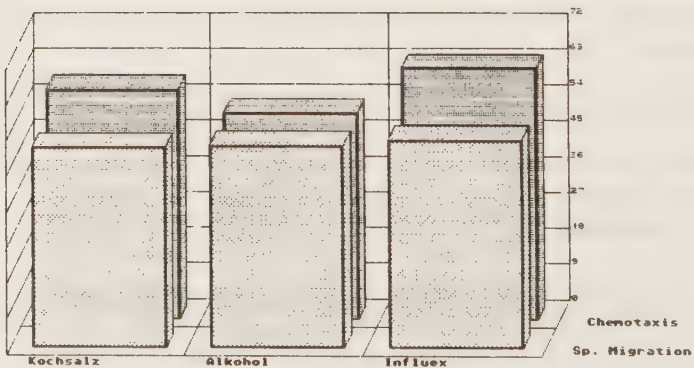


Abb. 4.4.1: Spontane Migration und Chemotaxis von PMN nach Vorinkubation mit verschiedenen Testlösungen (auf dem Bildschirm abgemessene Werte in Millimeter)

4.5 Phagozytostest

4.5.1 Granulozytenisolation

Bei 9 im Substanzendversuch eingesetzten Schweinen wurden die Ausbeute, Reinheit und Vitalität der isolierten Granulozytenfraktion bestimmt.

Die PRC-Schicht wurde durchschnittlich bis auf ein Volumen von 6 ml abgehebert. Aus den daraus zur Weiterbehandlung entnommenen 4 ml PRC wurden durchschnittlich $42,3 \times 10^6$ Leukozyten ($SD = 11,8 \times 10^6$) isoliert. Der mittlere Anteil an Granulozyten im Zellisolat betrug 94,7 % ($SD = 1,3$). Durchschnittlich 99 % ($SD = 0,7$) der Leukozyten nahmen unmittelbar nach der Isolation den Farbstoff Trypanblau nicht auf.

4.5.2 Stimulation in vitro

4.5.2.1 Konzentrationsvorversuch

Es wurden im Konzentrationsvorversuch Zellen von insgesamt 9 Schweinen eingesetzt.

Der mittlere Phagozytoseindex in den Ansätzen, bei denen anstelle von Testsubstanz 0,9 %ige Kochsalzlösung zugegeben wurde, lag bei 0,57 ($SD = 0,12$).

Die untersuchten Verdünnungsstufen von Influenza beeinflussten bei den verschiedenen Vorinkubationszeiten die Phagozytoseindizes folgendermaßen (vgl.

Tab. 8.3.2-9):

Die weniger stark verdünnten Influenzälösungen führten im allgemeinen zu einer Verringerung der ermittelten Phagozytoseindizes.

Bei Konzentrationen von 10^{-3} – 10^{-2} µg Echinacosid je Milliliter Inkubationsansatz ergaben sich zumeist Steigerungen der Phagozytoseraten, die teilweise signifikant waren.

Bei den am stärksten verdünnten Influenzälösungen ist der Einfluß auf den Phagozytoseindex uneinheitlich.

Vorinkubations- zeit (min)	10	20	30	40
Echinacosidkon- zentration ($\mu\text{g/ml}$)				
10^0	-73,0 $n=2$ (SD=11,3)	-54,0 $n=2$ (SD=16,9)	-37,5 $n=2$ (SD=17,6)	n.u.
10^{-1}	-30,5 $n=2$ (SD=12,0)	-17,5 $n=2$ (SD= 3,5)	+17,0 $n=2$ (SD= 1,4)	n.u.
10^{-2}	- 4,5 $n=2$ (SD=20,5)	+ 9,6 $n=9$ (SD=36,3)	+45,2* $n=9$ (SD=52,7)	+40,7* $n=7$ (SD=32,7)
10^{-3}	+13,5 $n=2$ (SD=16,2)	+16,0 $n=7$ (SD=25,3)	+45,8* $n=7$ (SD=30,0)	+43,4 $n=7$ (SD=56,7)
10^{-4}	n.u.	+ 9,8 $n=5$ (SD=34,9)	+18,4 $n=5$ (SD=22,1)	+32,8 $n=5$ (SD=34,0)
10^{-5}	n.u.	+20,4* $n=7$ (SD=23,4)	+23,4 $n=7$ (SD=36,7)	+31,1 $n=7$ (SD=35,4)
10^{-6}	n.u.	-22,5 $n=2$ (SD=16,3)	+20,5 $n=2$ (SD= 0,7)	- 2,5 $n=2$ (SD=13,4)
10^{-7}	n.u.	- 4,5 $n=2$ (SD=14,8)	- 4,0 $n=2$ (SD= 9,9)	+ 1,0 $n=2$ (SD= 8,5)

Tab. 4.5.2.1.1: Prozentuale Abweichungen der Phagozytoseindizes gegen-
über der Kochsalzkontrolle bei verschiedenen Vorinku-
bationszeiten und Inflüxverdünnungsstufen
n.u. = nicht untersucht, *: $p < 0,05$; *: $p < 0,01$

Abbildungen 4.5.2.1.1–4 zeigen Abweichungen der Phagozytoseindizes für jeweils 8 Konzentrationen von Inflüx-Tropfen: von links nach rechts: 10^0 – 10^{-7} μg Echinacosid/ml im Inkubationsansatz.

Abbildungen 4.5.2.1.5–12 zeigen entsprechende Abweichungen für jeweils 4 verschiedene Vorinkubationszeiten: von links nach rechts: 10 – 40 Minuten.

Dick umrandete Balken stellen signifikante Abweichungen dar.

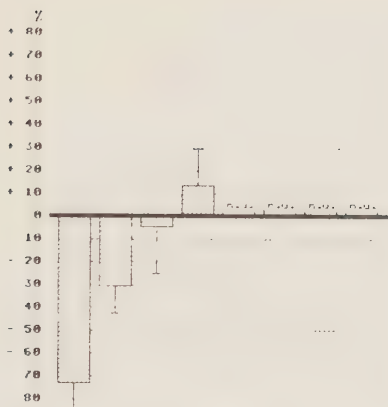


Abb. 4.5.2.1.1: Vorinkubationszeit 10 min

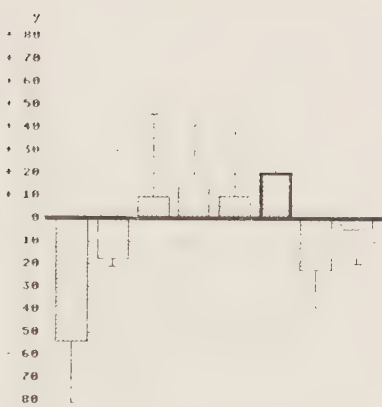


Abb. 4.5.2.1.2: Vorinkubationszeit 20 min

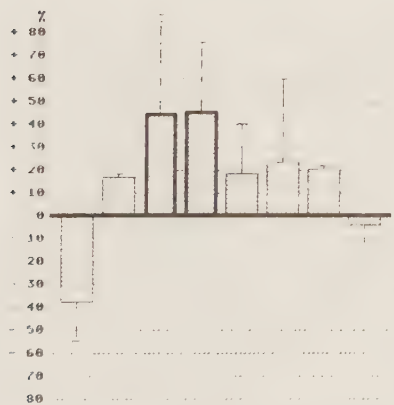


Abb. 4.5.2.1.3: Vorinkubationszeit 30 min

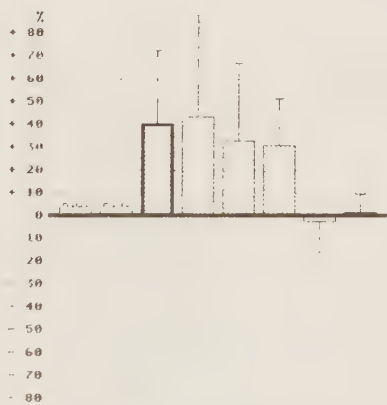


Abb. 4.5.2.1.4: Vorinkubationszeit 40 min

Abb. 4.5.2.1.1-4: Abweichung der Phagozytoseindizes für je 8 verschiedene Konzentrationen von Influenz-Tropfen bei 4 Vorinkubationszeiten (vgl. S.44)

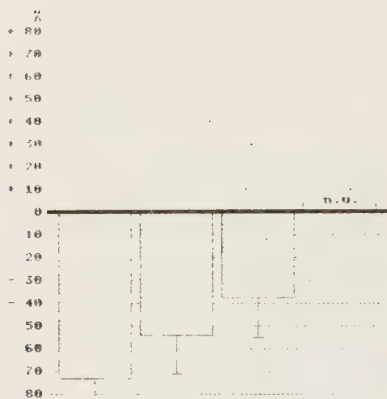


Abb. 4.5.2.1.5: $10^0 \mu\text{g}$ Echinacosid/ml



Abb. 4.5.2.1.6: $10^{-1} \mu\text{g}$ Echinacosid/ml

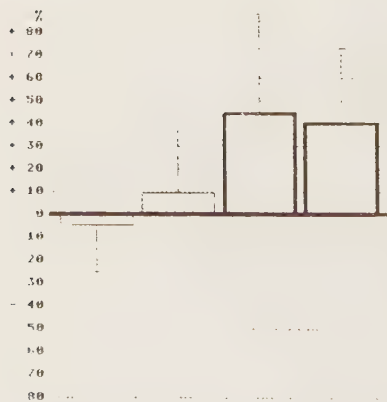


Abb. 4.5.2.1.7: $10^{-2} \mu\text{g}$ Echinacosid/ml

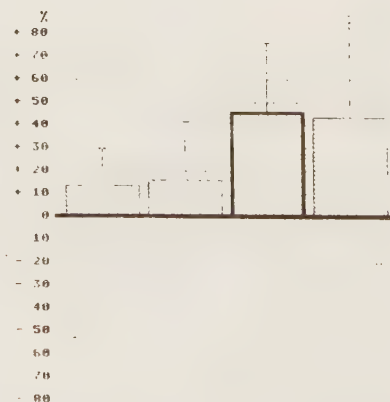


Abb. 4.5.2.1.8: $10^{-3} \mu\text{g}$ Echinacosid/ml

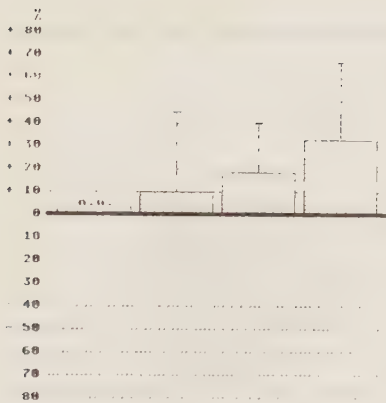


Abb. 4.5.2.1.9: $10^{-4} \mu\text{g}$ Echinacosid/ml

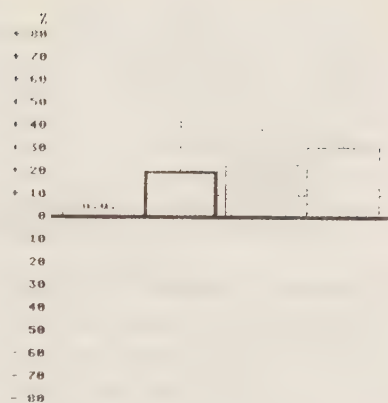


Abb. 4.5.2.1.10: $10^{-5} \mu\text{g}$ Echinacosid/ml

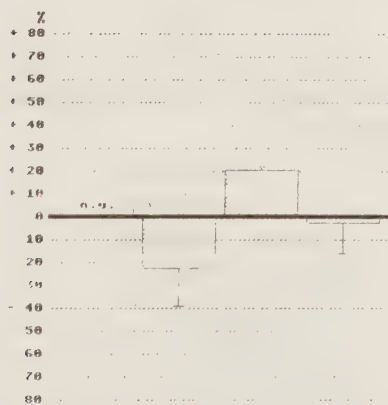


Abb. 4.5.2.1.11: $10^{-6} \mu\text{g}$ Echinacosid/ml

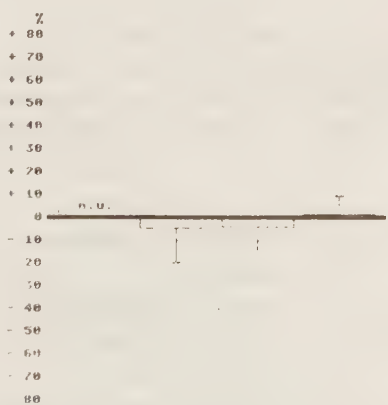


Abb. 4.5.2.1.12: $10^{-7} \mu\text{g}$ Echinacosid/ml

Abb. 4.5.2.1.5-12: Abweichungen der Phagozytoseindizes für je 4 Vorinkubationszeiten bei 8 Konzentrationen von Influx-Tropfen (vgl. S. 44)

Für den Substanzendversuch wurden die echinaceahaltigen Präparate auf einen Echinacosidgehalt von 0,01 µg/ml Inkubationsansatz eingestellt. Als Vorinkubationszeit wurden 20 Minuten gewählt.

4.5.2.2 Substanzendversuch

Es wurden im Substanzendversuch Zellen von 9 Schweinen eingesetzt.

Opsonisierung der Hefezellen mit Schweineserumpool (vgl. Tab. 8.3.11):

Bei den Ansätzen, zu denen anstelle von Testlösung Kochsalzlösung gegeben worden war, wurde ein mittlerer Phagozytoseindex von 0,76 (SD = 0,21) gemessen. Für die untersuchten Testlösungen wurden folgende Phagozytoseraten bestimmt:

Alkohollösung	0,32 (SD = 0,14)
Echinacea Ø, alkoholisch	0,43 (SD = 0,24)
Echinacea Ø, entalkoholisiert	0,85 (SD = 0,29)
Influx, alkoholisch	0,97 (SD = 0,19)
Influx, entalkoholisiert	1,03 (SD = 0,40)

Aus den Abweichungen der Phagozytoseindices gegenüber der Kochsalzkontrolle wurden für die Testlösungen folgende Werte gemittelt:

Alkohollösung	- 58,1 % (SD = 12,8) †
Echinacea Ø, alkoholisch	- 45,8 % (SD = 20,1) *
Echinacea Ø, entalkoholisiert	+ 11,2 % (SD = 22,6)
Influx, alkoholisch	+ 30,9 % (SD = 22,9) †
Influx, entalkoholisiert	+ 36,0 % (SD = 34,3) ‡

Tab. 4.5.2.2.1: Mittlere prozentuale Abweichung der Phagozytoseindices verglichen mit der Kochsalzkontrolle (Opsonisierung mit Schweineserumpool), †: $p < 0,05$; *: $p < 0,01$

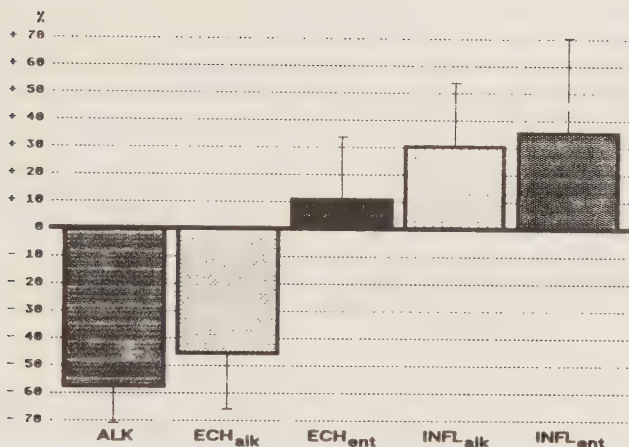


Abb. 4.5.2.2.1: Abweichungen der Phagozytoseindizes für 5 verschiedene Testlösungen (Legende vgl. unten)

Folgende durchschnittliche Anteile der ausgezählten Granulozyten hatten in den verschiedenen Ansätzen mindestens eine Hefezelle inkorporiert:

Kochsalzlösung	39,7 % (SD = 9,0)
Alkohollösung	20,8 % (SD = 7,7)
Echinacea Ø, alkoholisch	24,2 % (SD = 10,1)
Echinacea Ø, entalkoholisiert	39,3 % (SD = 8,2)
Influeux, alkoholisch	44,4 % (SD = 9,1)
Influeux, entalkoholisiert	45,7 % (SD = 9,9)

Die folgenden Abbildungen zeigen die Anteile der Granulozyten, die 1 bzw. 2 bzw. 3 ... bzw. 6 Hefezellen aufgenommen haben, bezogen auf die Gesamtzahl der an der Phagozytose beteiligten Granulozyten. NaCl, ALK, ECH_{ent}, ECH_{alk}, INFL_{ent}, INFL_{alk}, bezeichnen die Proben, die mit Kochsalzlösung, Alkohollösung, entalkoholisierter Echinacealösung, alkoholischer Echinacealösung, entalkoholisierten Influeux-Tropfen bzw. alkoholisch gelösten Influeux-Tropfen vorinkubiert worden waren.

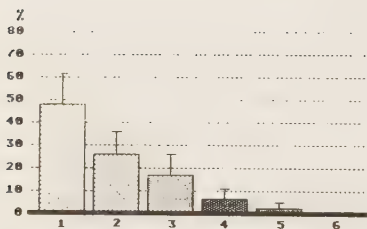


Abb. 4.5.2.2.2: Vorinkubation NaCl



Abb. 4.5.2.2.3: Vorinkubation ALK



Abb. 4.5.2.2.4: Vorinkubation ECH_{ent}

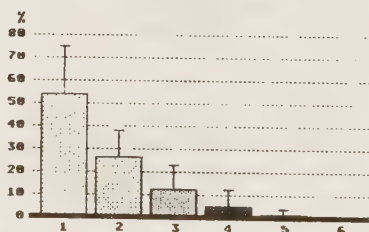


Abb. 4.5.2.2.5: Vorinkubation ECH_{alk}

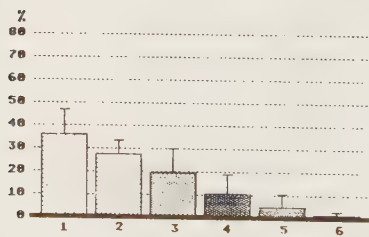


Abb. 4.5.2.2.6: Vorinkubation INFL_{ent}

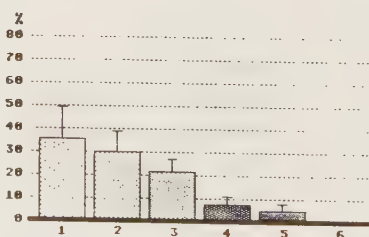


Abb. 4.5.2.2.7: Vorinkubation INFL_{alk}

Abb. 4.5.2.2.2-7: Verteilung der Phagozytoseaktivität innerhalb der phagozytierenden Granulozyten bei Vorinkubation mit 6 verschiedenen Testlösungen. (Opsonisierung mit Schweineserumpool, vgl. S. 49)

Opsonisierung der Hefezellen mit Fetalem Schweineserum (vgl. Tab. 8.3.12):

Bei den Ansätzen, zu denen anstelle von Testlösung Kochsalzlösung gegeben worden war, wurde ein mittlerer Phagozytoseindex von 0,90 (SD = 0,22) gemessen. Für die untersuchten Testlösungen wurden folgende Phagozytoseraten bestimmt:

Alkohollösung	0,52 (SD = 0,13)
Echinacea Ø, alkoholisch	0,76 (SD = 0,28)
Echinacea Ø, entalkoholisiert	0,96 (SD = 0,24)
Influx, alkoholisch	1,10 (SD = 0,17)
Influx, entalkoholisiert	1,12 (SD = 0,17)

Aus den Abweichungen der Phagozytoseindices gegenüber der Kochsalzkontrolle wurden für die Testlösungen folgende Werte gemittelt:

Alkohollösung	- 40,3 % (SD = 13,1) *
Echinacea Ø, alkoholisch	- 16,0 % (SD = 20,4)
Echinacea Ø, entalkoholisiert	+ 10,4 % (SD = 30,6)
Influx, alkoholisch	+ 23,7 % (SD = 18,0) *
Influx, entalkoholisiert	+ 30,3 % (SD = 39,4) #

Tab. 4.5.2.2.2: Mittlere prozentuale Abweichung der Phagozytoseindices verglichen mit der Kochsalzkontrolle (Opsonisierung mit Fetalem Schweineserumpool), #: $p < 0,05$; *: $p < 0,01$

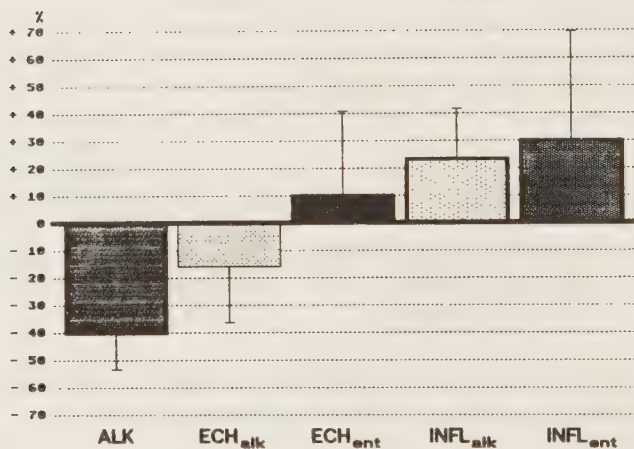


Abb. 4.5.2.2.8: Abweichungen der Phagozytoseindizes für 5 verschiedene Testlösungen (Legende vgl. S. 49)

Folgende durchschnittliche Anteile der ausgezählten Granulozyten hatten in den verschiedenen Ansätzen mindestens eine Hefezelle inkorporiert:

Kochsalzlösung	37,9 % (SD = 9,5)
Alkohollösung	27,9 % (SD = 6,5)
Echinacea Ø , alkoholisch	34,9 % (SD = 11,1)
Echinacea Ø , entalkoholisiert	40,0 % (SD = 7,7)
Influenza, alkoholisch	42,4 % (SD = 6,5)
Influenza, entalkoholisiert	44,4 % (SD = 5,9)

Die folgenden Abbildungen zeigen die Anteile der Granulozyten, die 1 bzw. 2 bzw. 3 ... bzw. 6 Hefezellen aufgenommen haben; bezogen auf die Gesamtzahl der an der Phagozytose beteiligten Granulozyten (vgl. S. 49).

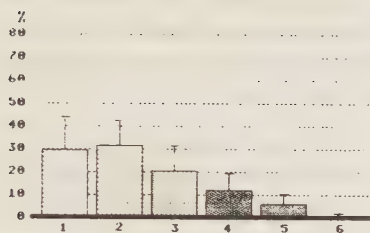


Abb. 4.5.2.2.9: Vorinkubation NaCl

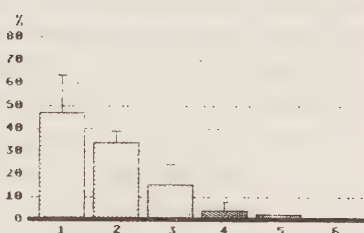


Abb. 4.5.2.2.10: Vorinkubation ALK

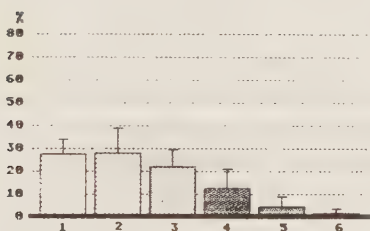


Abb. 4.5.2.2.11: Vorinkubation ECH_{ent}

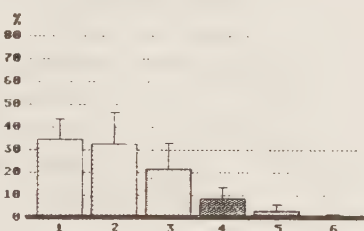


Abb. 4.5.2.2.12: Vorinkubation ECH_{alk}



Abb. 4.5.2.2.13: Vorinkubation INFL_{ent}

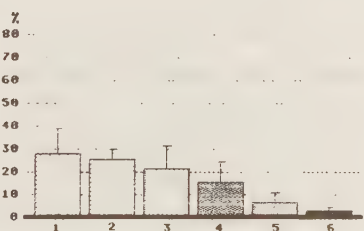


Abb. 4.5.2.2.14: Vorinkubation INFL_{alk}

Abb. 4.5.2.2.9–14: Verteilung der Phagozytoseaktivität innerhalb der phagozytierenden Granulozyten bei Vorinkubation mit 6 verschiedenen Testlösungen (Ops. mit Fetalem Schweineserumpool, vgl. S. 49)

Bei Inkubationsansätzen, die mit Schweineserumpool opsonisierte Hefezellen enthielten, wurden im Schnitt niedrigere Phagozytoseraten gemessen, als bei solchen, die mit fetalem Schweineserum opsonisierte Hefe enthielten. Für die verschiedenen Testlösungen ergaben sich folgende gemittelte Unterschiede:

Kochsalzlösung	- 14,8 % (SD = 17,8)
Alkohollösung	- 39,1 % (SD = 23,2) *
Echinacea Ø, alkoholisch	- 44,5 % (SD = 23,9) *
Echinacea Ø, entalkoholisiert	- 7,3 % (SD = 43,0)
Infloux, alkoholisch	- 10,6 % (SD = 17,9)
Infloux, entalkoholisiert	- 8,8 % (SD = 27,5)

Tab. 4.5.2.2.2: Mittlere prozentuale Abweichung der Phagozytoseraten bei durch Schweineserumpool opsonisierten Hefezellen verglichen mit durch Fetales Schweineserum opsonisierten Hefezellen. *: $p < 0,01$

4.5.3 Stimulation in vivo

4.5.3.1 Blutbilder

Gesamtleukozytenzahl (vgl. Tab. 8.3.14-19):

Folgende Gesamtleukozytenzahlen wurden an den einzelnen Versuchstagen bestimmt (jeweils Mittelwerte von 8 Schweinen; nach Korrektur der Verdünnung durch den Gerinnungshemmer, Mio/ml):

	Kontrollgruppe	Versuchsgruppe
Tag 1 bzw. 2:	13,0 (SD = 2,7)	15,1 (SD = 4,2)
Tag 3 bzw. 4:	14,0 (SD = 5,2)	13,5 (SD = 2,4)
Tag 8 bzw. 9:	16,6 (SD = 2,9)	13,7 (SD = 2,9)

Die Erhöhung der Gesamtleukozytenzahl in der Kontrollgruppe am Tag 8/9 verglichen mit Tag 1/2 ist auf dem 5 %-Niveau signifikant.

Differentialblutbild (vgl. Tab. 8.3.14–19):

Folgende Zusammensetzung der Leukozytenfraktion wurde an den einzelnen Versuchstagen bestimmt (jeweils Mittelwerte von 8 Schweinen, Angaben als %, in Klammern: SD):

Kontrollgruppe:

	Neutro	Baso	Eosino	Mono	Lympho
Tag 1/2	23,9(3,7)	0	3,7(1,4)	1,9(1,1)	70,6(3,4)
Tag 3/4	25,7(10,3)	1,0(1,4)	3,1(1,4)	2,2(1,0)	67,8(10,7)
Tag 8/9	28,9(9,2)	0,4(0,7)	3,2(1,8)	1,9(1,4)	65,6(8,6)

Versuchsgruppe:

	Neutro	Baso	Eosino	Mono	Lympho
Tag 1/2	28,5(6,0)	0	1,9(1,4)	2,6(2,2)	67,0(5,1)
Tag 3/4	32,2(7,0)	0,3(0,5)	1,4(1,5)	2,2(1,5)	58,9(14,1)
Tag 8/9	29,4(10,3)	0,5(0,5)	3,1(1,1)	1,9(1,2)	66,3(7,9)

Die Anzahl der Neutrophilen Granulozyten im Blut beträgt an den einzelnen Tagen (Mittelwerte von 8 Schweinen; Mio/ml):

	Kontrollgruppe	Versuchsgruppe
Tag 1 bzw. 2	3,2 (SD = 1,0)	4,4 (SD = 1,7)
Tag 3 bzw. 4	3,5 (SD = 1,8)	4,4 (SD = 1,6)
Tag 8 bzw. 9	5,0 (SD = 2,2)	4,0 (SD = 1,8)

Die Erhöhung der Anzahl Neutrophiler Granulozyten in der Kontrollgruppe am Tag 8/9 verglichen mit Tag 1/2 ist auf dem 5 %- Niveau signifikant.

4.5.3.2 Phagozytoseraten

Folgende Indices wurden als Durchschnittswerte von je 8 Schweinen (jeweils 3 Parallelansätze) ermittelt (vgl. Tab. 8.3.20-21):

	Kontrollgruppe	Versuchsgruppe
Tag 1 bzw. 2	0,32 (SD = 0,14)	0,46 (SD = 0,15)
Tag 3 bzw. 4	0,31 (SD = 0,09)	0,66 (SD = 0,25)
Tag 8 bzw. 9	0,46 (SD = 0,18)	0,56 (SD = 0,12)

Verglichen mit Tag 1/2, also mit den Werten vor der ersten Injektion, ergaben sich im Mittel folgende prozentuale Veränderungen der Phagozytoserate:

	Kontrollgruppe	Versuchsgruppe
Tag 3 bzw. 4	+ 7,1 (SD = 41,9)	+ 51,3 (SD = 66,1)
Tag 8 bzw. 9	+ 67,2 (SD = 79,7)	+ 31,6 (SD = 48,9)

Die Erhöhung der Phagozytoserate in der Versuchsgruppe am Tag 3/4 ist auf dem 1 %-Niveau signifikant.

Bei Vergleich von Tag 3/4 mit Tag 1/2 beträgt die mittlere Veränderung der Phagozytoseindices in der Kontrollgruppe - 0,008 (SD = 0,12) Einheiten, in der Versuchsgruppe + 0,20 (SD = 0,23) Einheiten. Die Nullhypothese der Gleichheit der Mittelwerte beider Zahlenreihen muß bei einer vorgegebenen Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % verworfen werden (einseitiger Test).

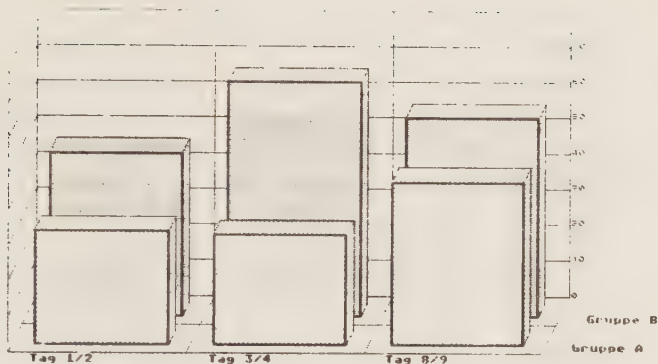


Abb. 4.5.3.2.1: Durchschnittswerte der Phagozytoseindizes von jeweils 8 Schweinen (Ordinatenwerte $\times 10^{-2}$, vgl. 3.5.15.3)

Die Indices der Einzeltiere veränderten sich folgendermaßen:

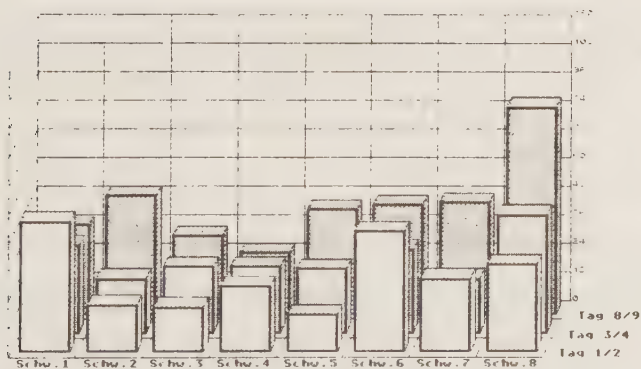


Abb. 4.5.3.2.2: Kontrollgruppe: Indices der einzelnen Schweine als Mittelwerte aus je 3 Parallelansätzen (Ordinatenwerte $\times 10^{-2}$)

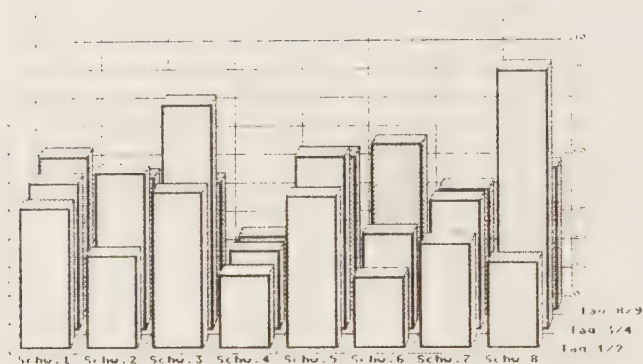


Abb. 4.5.3.2.3: Versuchsgruppe: Indices der einzelnen Schweine als Mittelwerte aus je 3 Parallelansätzen (Ordinatenwerte $\times 10^{-2}$)

Für die Abhängigkeit der mittleren prozentualen Zunahme der Gesamtleukozytenzahl und der mittleren prozentualen Zunahme des Phagozytoseindex in der Kontrollgruppe bei Vergleich von Tag 1/2 und Tag 8/9 errechnet sich eine Rangkorrelation von $r_s = 0,5238$. Für die Signifikanz von r_s ergibt sich: $0,05 < p < 0,1$. Dieselbe Korrelation errechnet sich, wenn anstelle der Gesamtleukozytenzahl die Zahl der Neutrophilen Granulozyten in 1 ml Blut betrachtet wird.

4.5.4 Serumeinfluß

Es wurden Neutrophile Granulozyten aus dem Blut von 3 Schlachtschweinen untersucht.

Für die Ansätze, die mit der Alkohollösung inkubiert wurden, die im Inkubationsansatz eine Konzentration von $8 \times 10^{-4}\%$ (v/v) ergibt, wurden folgende Indices bestimmt (in Klammern: SD, vgl. Tab. 8.3.13):

- * Hefe opsonisiert mit Schweineserumpool 0,88 (0,29)
- * Hefe opsonisiert mit Fetalem Schweineserumpool 1,04 (0,03)

Die unterschiedlich behandelten Hefezellen wurden folgendermaßen phagozytiert:

* Hefe nicht opsonisiert	0,13 (0,03)
* Hefe opsonisiert mit Schweineserumpool	0,97 (0,23)
* Hefe opsonisiert mit Fetalem Schweineserumpool	1,08 (0,13)
* Hefe opsonisiert mit inakt. Schweineserumpool	0,81 (0,23)
* Hefe opsonisiert mit inakt. Fet. Schweineserumpool	0,10 (0,03)

4.6 Chemolumineszenztest

Granulozyten von 9 Schlachtschweinen wurden im Chemolumineszenztest untersucht.

Spontane Chemolumineszenz während der Vorinkubation (vgl. Tab. 8.4.2):

Die mittlere Chemolumineszenzaktivität der Kochsalzkontrollen betrug im Integrationszeitraum von 30 Minuten $66,9 \times 10^6$ counts (SD = $25,7 \times 10^6$).

Der Verlauf der Chemolumineszenzaktivität während des Meßzeitraumes wird durch die Abbildung 4.6.1. beispielhaft veranschaulicht.

Die untersuchten Proben ergaben im Vergleich zur Kochsalzkontrolle durchschnittlich folgende Abweichungen in der Chemolumineszenzaktivität:

Influx-Tropfen	- 22,7 % (SD = 25,2)
Echinacea Ø	+ 18,2 % (SD = 35,5)
Alkohol $2,4 \times 10^{-3}\%$	- 0,1 % (SD = 45,8)
Alkohol $2,4 \times 10^{-6}\%$	+ 10,0 % (SD = 16,6)

Die Hemmung der Chemolumineszenz durch Influx-Tropfen ist auf dem 5 %-Niveau signifikant.

Zu Abb. 4.6.2 und 4.6.4: INFL_{ent} , ECH_{ent} , $\text{ALK } 10^{-3}$ bzw. $\text{ALK } 10^{-6}$ bezeichnen die Ansätze, zu denen entalkoholisierte Influx-Tropfen, entalkoholisierte Echinacea-Urtinktur, Äthanollösung der Konzentration $2,4 \times 10^{-3}$ bzw. $2,4 \times 10^{-6} \%$ (v/v) zugegeben wurde.

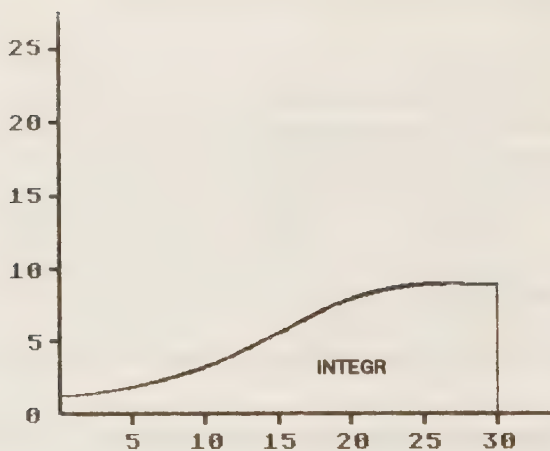


Abb. 4.6.1: Verlauf der spontanen Chemolumineszenz bei Vorinkubation mit Kochsalzlösung, Integr: Integration der Impulse über 30 min
Abszisse: Zeit in min; Ordinate: Lichtimpulse in Mio counts/min

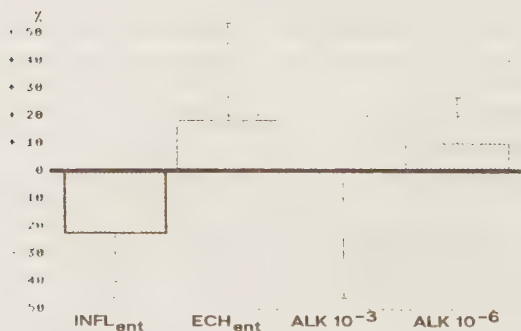


Abb. 4.6.2: Prozentuale Abweichung der spontanen Chemolumineszenz bei Zugabe von 5 verschiedenen Testlösungen (vgl. S. 59)

Chemolumineszenz der durch Zymosan stimulierten Zellen (vgl. Tab. 8.4 3):

Die Chemolumineszenzaktivität der Kochsalzkontrollen betrug während der ersten 20 Minuten nach Zymosanzugabe im Durchschnitt $358,8 \times 10^6$ counts (SD = $150,7 \times 10^6$).

Der Verlauf der Chemolumineszenzaktivität während des Meßzeitraumes wird durch folgende Abbildung beispielhaft veranschaulicht:

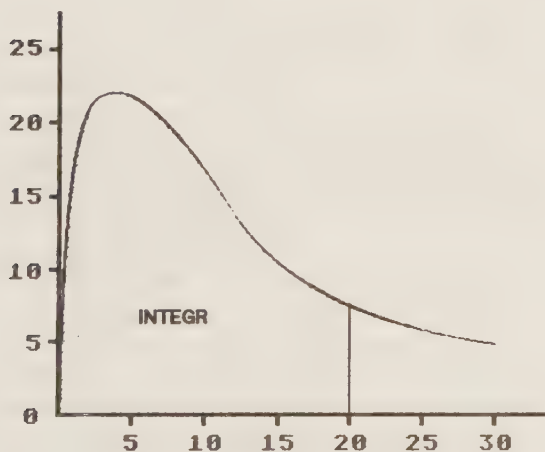


Abb. 4.6.3: Verlauf der Chemolumineszenz nach Stimulierung mit Zymosan, Vorinkubation mit 0,9 %iger Kochsalzlösung (Legende vgl. Abb. 4.6.1, Integrationszeit: 20 min)

Die untersuchten Lösungen ergaben im Vergleich zur Kochsalzkontrolle im Mittel folgende Abweichungen in der Chemolumineszenzaktivität:

Influenx-Tropfen	- 4,8 % (SD=11,2)
Echinacea Ø	+ 8,6 % (SD=11,6)
Alkohol $2,4 \times 10^{-3}\%$	+ 2,3 % (SD=22,1)
Alkohol $2,4 \times 10^{-6}\%$	+ 4,5 % (SD=12,2)

Die Stimulierung der Chemolumineszenz durch Echinacea Ø ist auf dem 5 %-Niveau signifikant.

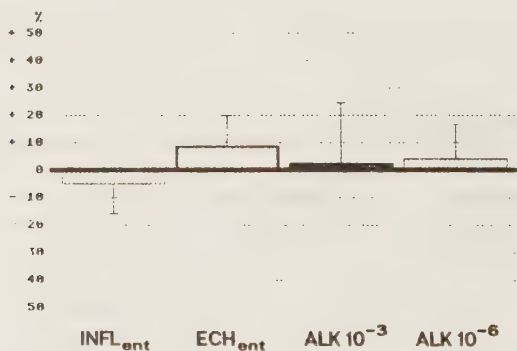


Abb. 4.6.4: Prozentuale Abweichung der stimulierten Chemolumineszenz bei Zugabe von 5 verschiedenen Testlösungen (vgl. S. 59)

5 DISKUSSION

Die Besprechung der Methoden und Ergebnisse erfolgt in der im Kapitel 4 eingehaltenen Reihenfolge. Abschnitt 5.6 stellt die Einzelergebnisse vergleichend nebeneinander.

5.1 Blutbilder

Die Gesamtzahl der Leukozyten im Blut der in den in vitro-Tests untersuchten Schlachtschweine lag im Normalbereich. Im Differentialblutbild zeigte sich jedoch eine relative und absolute Neutrophilie sowie eine relative und absolute Lymphopenie (vgl. S. 37; SCHULZE et al., 1980).

Derartige Verschiebungen im Differentialblutbild finden sich häufig unter Einwirkung von Stressoren (KRAFT und DÜRR, 1981) und sind deshalb vermutlich den Transport- und Schlachtbedingungen zuzuschreiben.

Die Granulozytenisolation erfolgte nach der von FIELD (1985) beschriebenen Methode. Diese Technik wurde gewählt, da bei einer Isolation über Ficoll/Hypaque (BÖYUM, 1967) nach eigenen Erfahrungen die Vitalität der isolierten Zellen teilweise stark reduziert war. Außerdem ist die Migration von derart gewonnen Granulozyten gehemmt (ROTH and KAEBERLE, 1981).

Die Zellausbeute und Reinheit der untersuchten Granulozytenisolate (> 91 % PMN im Isolat) stimmte mit den von FIELD beschriebenen Werten überein.

5.2 Adhärenz

5.2.1 Methode

In Vorversuchen wurden die beiden beschriebenen Methoden zur Messung der Adhärenz auf ihre Anwendbarkeit beim Schwein untersucht. Es zeigte sich, daß mit der Nylonwattemethode etwas höhere Retentionen erzielt wurden, als für den Menschen beschrieben (MACGREGOR et al., 1974). Die Unterschiede zwischen Doppel- und Dreifachansätzen waren so groß, daß diese Methode für quantitative Untersuchungen beim Schwein nicht geeignet erschien. Als kritisch erwies sich die Dichte der Packung der Nylonwatte, die nicht standardisierbar war (SCHNEIER et al., 1977, LORENTE et al., 1978).

Die Reproduzierbarkeit von mit der Glasperlenmethode erzielten Ergebnissen war demgegenüber zufriedenstellend, allerdings ist sie nur für die Untersuchung von Granulozyten im Vollblut geeignet (SCHNEIER et al., 1977). Sie erlaubt deshalb nur etwas weniger spezifische Aussagen über das Verhalten einer bestimmten Leukozytensubpopulation.

Eine Schwierigkeit, die beiden Methoden anhaftet, liegt darin, daß ein gewisser, möglicherweise schwankender Teil der auf die Säule aufgetragenen Zellen in der kapillar zurückgehaltenen Flüssigkeit verbleibt. Das Nachspülen der Glasperlen-Säule kann diesen Unsicherheitsfaktor wohl verringern, trotzdem erscheinen derartige In vitro-Tests zur Beurteilung geringer Unterschiede in der Adhärenz als nur bedingt geeignet.

5.2.2 Ergebnisse

Für die Retention von Schweinegranulozyten wurde, bei nahezu gleichen Versuchsbedingungen eine um 50 % geringere Retention als bei entsprechenden Zellen vom Menschen gemessen (LORENTE et al., 1978).

Alkoholzugabe setzte die Retention stark herab, während unter Influxwirkung deutlich mehr Zellen auf der Säule verblieben (Abb. 4.3.2). Eine Hemmung der Adhärenz von Granulozyten wurde auch mit der Nylonwattemethode gemessen (MACGREGOR et al., 1974).

Eine Beeinflußbarkeit der Adhärenz scheint über Einwirkungen auf den Energiestoffwechsel oder den kontraktilen Apparat der Zelle möglich (SMITH and LUMSDEN, 1983). Unterschiedliche Retentionen, hervorgerufen durch Einflüsse der Alkohollösung oder von Influx-Tropfen auf das Testsystem (z.B. durch Veränderung der Oberflächeneigenschaften der Glasperlen oder Verklumpungen der Blutzellen) lassen sich nicht ausschließen, für die letztgenannte Möglichkeit ergaben sich jedoch bei der mikroskopischen Untersuchung der Eluate keine Hinweise.

5.3 Chemotaxis

5.3.1 Methode

Die von NELSON (1975) beschriebene Methode der Messung der Leukozytenmigration unter Agarose konnte mit geringen Abänderungen für die Untersuchung

von Schweinegranulozyten übernommen werden. Agarose läßt sich im Testsystem ohne Einfluß auf die Ergebnisse durch Agar ersetzen (BELSHEIM, 1981). Der Unter-Agarose-Technik wurde gegenüber der Boyden-Kammer der Vorzug gegeben, weil letztere, abhängig von der Charge der verwendeten Mikrofilter, stark differierende Ergebnisse produziert und die Auswertung mit Unsicherheiten behaftet ist (SMITH and LUMSDEN, 1983).

Als Chemotaxin wurde aktiviertes Serum (C5a) gewählt, das zwar schlechter standardisierbar ist als die bei menschlichen Phagozyten angewendeten synthetischen Chemotaxine, für diese sind jedoch bei Schweinegranulozyten keine Rezeptoren nachzuweisen (CHENOWETH et al., 1980).

5.3.2 Ergebnisse

Die für die Kochsalzkontrollen bestimmten Werte für die random migration und die Chemotaxis stimmen gut mit den von SMITH et al. (1985) unter fast identischen Versuchsbedingungen gemessenen Strecken überein. Menschliche Granulozyten durchwandern bei ähnlichem Versuchsdesign entgegen einem chemotaktischen Gradienten gleich große Strecken, während die random migration nur 25-30 % der bei porcinen Granulozyten gemessenen Werte beträgt (NELSON, 1974). Es bestehen also deutliche speziesspezifische Unterschiede im Migrationsverhalten.

Der Einfluß von Alkohollösung bzw. Influx-Tropfen auf die random migration war gering und nicht signifikant. Die Chemotaxis (sowohl die durchwanderte Strecke, als auch der chemotaktische Index) wurde durch Alkohol leicht, aber signifikant gehemmt, während Influx-Tropfen leicht stimulierend wirkten (Abb. 4.4.1). Die nicht, bzw. nur leicht hemmenden Effekte von Alkohol auf die nicht gerichtete Granulozytenmigration wird von HALLENGREN und FORSGREN (1978) bestätigt.

Eine unabhängige Beeinflußbarkeit von random migration und Chemotaxis wird für verschiedene Substanzen beschrieben (SPISANI et al., 1982, SMITH and LUMSDEN, 1983). Da Alkohol bzw. Influx-Tropfen nur die Chemotaxis beeinflussen, liegt die Vermutung nahe, daß sie entweder besonders auf den für die Orientierung der Zelle wichtigen Mikrotubulusapparat oder auf Rezeptormechanismen, die das Erkennen des chemotaktischen Gradienten erlauben, einwirken.

5.4 Phagozytose

5.4.1 Methode

Es wurde zur Bestimmung der Phagozytoserate ein Testsystem gewählt, das sich bereits bei anderen Spezies für ähnliche Untersuchungen bewährt hat (WAGNER et al., 1985, REIFENBERG, 1987).

Folgende Modifikationen erschienen sinnvoll:

Durch Voropsonisierung der Hefe mit anschließendem Waschen können mögliche wechselnde Einflüsse von verschiedenen Serumbestandteilen (z.B. Komplementbruchstücke, Metaboliten des Blutgerinnungs-, Kininsystems), die bei Serumzugabe zum Phagozytoseansatz auftreten können, weitgehend ausgeschlossen werden.

Die Auswertung von Naßpräparaten schließt Zellverluste, wie sie beim Herstellen der Trockenpräparate (z.B. durch Abgießen bzw. Abspülen der Präparate) auftreten können, aus.

Zur Auswertung der Phagozytosepräparate wurden zwei neue mikroskopische Methoden entwickelt, um eine Differenzierung zwischen inkorporierten und adhären Hefezellen zu ermöglichen.

Lichtmikroskopische Methode:

LEHRER und CLINE (1969) und STÜBNER (1983) differenzieren in ihren Untersuchungen zwischen inkorporierten und nicht inkorporierten, hitzeinaktivierten Hefezellen, indem sie die Phagozytosepräparate mit Methylblau bzw. einer Eosinrot/Trypanblau-Mischung färben.

Die genannten Farbstoffe werden auch als Lebend-Tot-Farbstoffe bezeichnet, da sie die Zellmembranen lebender Zellen nicht oder kaum durchdringen und deshalb diese im Gegensatz zu toten Zellen nicht anfärben (BARGMANN, 1977). Derart gefärbte Präparate ermöglichen zwar die gewünschte Differenzierung, allerdings ist die Auszählung inkorporierter und deshalb ungefärbter Hefezellen schwierig und unsicher.

Der eigene Test bietet dagegen mit Trypanblau vorgefärbte Hefezellen zur Phagozytose an. Dies erleichtert die Auszählung der inkorporierten, kontrastreichen Partikel erheblich. Durch die Gegenfärbung der Präparate mit Eosinrot wird die Blaufärbung nicht inkorporierter Hefezellen überdeckt und die gewünschte Unterscheidung möglich.

Eine Beeinflussung der Opsonisierung und/oder Phagozytose durch eine mögliche Veränderung von Oberflächeneigenschaften vorgefärbter Hefezellen ist nicht auszuschließen.

Fluoreszenzmikroskopische Methode:

Die bisher verwendeten fluoreszenzmikroskopischen Techniken zur Bestimmung der Phagozytoserate sind mit verschiedenen Nachteilen behaftet:

PAROD und BRAIN (1986) und LEVITZ et al. (1987) färben nicht inkorporierte Phagozytosepartikel mit spezifischen, fluoreszeinkonjugierten Antikörpern bzw. mit Diaethanol. Neben dem erheblichen Aufwand der Herstellung der fluoreszeinkonjugierten Antikörper liegt bei beiden Methoden die Schwierigkeit darin, daß inkorporierte Partikel nicht fluoreszieren und deshalb, ungefärbt, bei normalem Durchlicht ausgezählt werden müssen.

Bei Verwendung von FITC-markierten Phagozytosepartikeln mit anschließendem Quenching der Fluoreszenz nicht inkorporierter Partikel (HED, 1977, ODA and MAEDA, 1986) wird dieser Nachteil vermieden. Allerdings sind Phagozyten, die keine Partikel aufgenommen haben, im Fluoreszenzlicht kaum auszumachen, zum andern ist eine Beeinflussung von Opsonisierung und/oder Phagozytose durch die FITC-Markierung möglich.

Acridinorange ist ein metachromatischer Fluoreszenzfarbstoff, der vorzugsweise an Nukleinsäuren bindet. An die Tertiärstruktur einer nativen DNS-Doppelhelix können sich Acridinorange-Moleküle aus sterischen Gründen nur als Monomere anlagern. Im monomeren Zustand fluoresziert Acridinorange grün. In ihrer Tertiärstruktur veränderte, denaturierte DNS-Doppelstränge oder ungepaarte DNS- oder RNS-Abschnitte erlauben die Bildung von Di- oder Polymeren angelagerter Acridinorange-Moleküle: es resultiert orangefarbene Fluoreszenz (PEARSE, 1980).

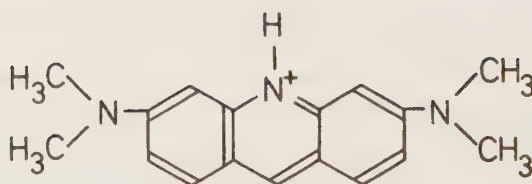


Abb. 5.4.1: Acridinorange

Färbt man einen Phagozytoseansatz, der lebende Granulozyten und abgetötete Hefezellen enthält, mit Acridinorange, so stellen sich die Kerne der Granulozyten leuchtend grün, die Hefezellen orangerot dar. Zu diesem Ansatz gegebenes Methylenblau dringt in nicht inkorporierte Hefezellen ein und unterdrückt deren Fluoreszenz vollständig ("Quenching"). Im mikroskopischen Präparat stellen sich nur Leukozyten und inkorporierte Hefezellen dar.

Die Farbe der inkorporierten Hefezellen nach Quenching schwankt von Präparat zu Präparat etwas, ihre Auszählung ist jedoch in jedem Fall einfach und sicher möglich.

Bemühungen, durch eine Kombination von Lebend-Tot-Farbstoffen (Methylenblau, Trypanblau, Eosinrot) mit hämatologischen oder histologischen Färbemethoden (May-Grünwald, Giemsa, Pappenheim, Azocarmin, Hämatoxylin, Fuchsin) Trockenpräparate herzustellen, die die geforderte Differenzierung erlauben, erbrachten wenig befriedigende Ergebnisse.

Für die eigenen Untersuchungen wurde die fluoreszenzmikroskopische Methode gewählt, da sie in der Anwendung weniger ermüdet und mit nicht vorgefärbten Hefezellen arbeitet.

5.4.2 Ergebnisse

Im Phagozytostest sollte die Wirkung von InflueX-Tropfen (vgl. S. 28) auf das Phagozytoseverhalten von Neutrophilen Granulozyten untersucht werden.

Außer dem Kombinationspräparat wurde auch die isolierte Echinacea-Komponente,

sowie der Einfluß des Lösungsvermittlers Alkohol ausgetestet. Opsonisierung der Hefe mit unterschiedlich behandelten Seren diente der näheren Charakterisierung der Aufnahme von Bäckerhefe.

Durch den in vivo-Versuch sollte die Übertragbarkeit von in vitro-Untersuchungen auf in vivo-Verhältnisse überprüft werden.

5.4.2.1 Konzentrationsvorversuch

Im Konzentrationsvorversuch wurde eine Verdünnungsstufe gesucht, bei der Influx-Tropfen in alkoholischer Lösung eine eindeutige, möglichst stimulierende Wirkung auf die Hefephagozytose haben. Um dem Präparat Gelegenheit zu geben, mit den Zellen in Wechselwirkung zu treten, wurden Granulozyten und Influx-Tropfen vor Zugabe der Hefezellen für unterschiedliche Zeiten vorinkubiert. Ein entsprechendes Vorgehen wird auch z.B. bei der Untersuchung von Mediatoreinflüssen auf Phagozyten gewählt (GAY et al., 1984, GNARPE et al, 1984).

Auswirkungen der Verdünnungsstufe (Tab. 4.5.2.1.1):

Die nur schwach verdünnten Influxlösungen setzten die Phagozytoserate deutlich herab. Verdünnungen, die auf 10^{-2} - 10^{-5} μg Echinacosid je Milliliter Inkubationsansatz eingestellt waren, führten zu einer geringen bis deutlichen Steigerung der Phagozytose. Dabei waren im Bereich von 10^{-2} - 10^{-3} $\mu\text{g/ml}$ signifikante Steigerungen zu verzeichnen. Die am stärksten verdünnten Influxlösungen hatten keine einheitliche Wirkung auf die Hefeinkorporation.

Auswirkungen der Vorinkubationszeit (Tab. 4.5.2.1.1):

Bei den beiden am schwächsten verdünnten Influxlösungen ging die hemmende Wirkung mit zunehmender Inkubationszeit etwas zurück. Bei den mittleren Verdünnungsstufen nahm die Stimulierung mit der Dauer der Vorinkubationszeit zu, wobei nach 30 Minuten ein Plateau erreicht war. Die stärksten Verdünnungsstufen ließen keine von der Vorinkubationszeit abhängige Tendenz erkennen.

REIFENBERG (1986) wählte zur Stimulation der Phagozytose von mononukleären Hühnerzellen die Konzentration von 0,1 μg Echinacosid/ml. (Es wurden Verdünnungsstufen des entalkoholisierten Präparates ohne eine Vorinkubation von

Zellen und Testlösung untersucht.) Bei Schweinegranulozyten wirkte diese Verdünnungsstufe in den eigenen Untersuchungen hemmend. Möglicherweise ist dies durch den höheren Alkoholgehalt der eingesetzten Aufbereitungsform bedingt oder es liegen tierartliche Unterschiede zugrunde.

Für den Substanzendversuch wurden zur Stimulierung von Schweinegranulozyten eine Vorinkubationszeit von 30 Minuten und eine Verdünnung der Präparate auf eine Echinacosidkonzentration von 0,01 µg je Milliliter Inkubationsansatz gewählt. Bei gleicher Stimulation wurde die Konzentrationsstufe von 10^{-2} µg/ml der von 10^{-3} µg/ml vorgezogen, weil in erster Linie Substanzwirkungen und nicht die Wirkungen von homöopathischen Potenzen untersucht werden sollten.

5.4.2.2 Substanzendversuch

Im Substanzendversuch wurden die Wirkungen von alkoholischen und entalkoholisierten InflueX-Tropfen, alkoholischer und entalkoholisierte Echinacea-Urtinktur und von Alkohol auf die Phagozytoserate miteinander verglichen.

Da die Ergebnisse bei Opsonisierung der Hefe mit Schweineserumpool und mit Fetalem Schweineserumpool tendenziell gleich waren, werden sie gemeinsam besprochen (Tab. 4.5.2.2.1 und 4.5.2.2.2).

Die Kochsalzkontrollwerte lagen im Substanzendversuch im Durchschnitt über denen des Konzentrationsvorversuches. Die im Konzentrationsvorversuch ermittelte Stimulierung der Phagozytose durch alkoholisch gelöste InflueX-Tropfen wurde im Substanzendversuch, auf etwas niedrigerem Niveau bestätigt. Die entalkoholisierte Aufbereitungsform stimulierte geringfügig stärker.

Die relative Stimulierung der Phagozytose von Schweinegranulozyten war stärker als die durch dasselbe Präparat erzielte Stimulierung von mononukleären Phagozyten des Huhnes (REIFENBERG, 1987).

Die entalkoholisierte Echinacea-Urtinktur stimulierte die Phagozytose von Schweinegranulozyten nur relativ schwach (um 10 – 11%). WAGNER (1986) wies für isolierte Heteroglykane aus Echinacea spez. in einer Konzentration von 0,01 µg/ml eine Stimulierung der Phagozytoserate von menschlichen Granulozyten um 27–32 % nach.

Die alkoholische Aufbereitungsform der Echinacea-Urtinktur hemmte die Phagozytose in den eigenen Untersuchungen deutlich. Die starke Unterdrückung der

Phagozytose durch die Alkohollösung legt die Vermutung nahe, daß die Hemmwirkung der alkoholischen Echinacea-Lösung vor allem durch die Alkoholkomponente verursacht wurde.

In Übereinstimmung mit REIFENBERG (1987) zeigen die vorliegenden Ergebnisse, daß das in Influx-Tropfen wirksame Prinzip nicht allein in den aus Echinacea extrahierten Substanzen liegt, sondern daß auch den in homöopathischen Verdünnungen vorliegenden Komponenten eine Beteiligung an der stimulierenden Wirkung zuzuschreiben ist.

Die festgestellte hemmende Wirkung der Alkohollösung auf die Phagozytose stimmt mit Beobachtungen bei menschlichen Phagozyten überein (SMITH and LUMSDEN, 1983), steht allerdings im Gegensatz zu den Verhältnissen beim Huhn (REIFENBERG, 1987). Die Alkoholwirkung ist vermutlich dafür verantwortlich zu machen, daß die alkoholische Influx-Lösung etwas schwächer stimuliert als die entalkoholisierte und die alkoholische Echinacea-Lösung im Gegensatz zur entalkoholisierten sogar hemmt.

Allerdings dürfen sicher keine einfachen additiven Wirkungen unterstellt werden, da neben der unmittelbaren Alkoholwirkung auf die Granulozyten auch mittelbare Einflüsse im Sinne einer Lösungsvermittlung für die Inhaltsstoffe von Influx bzw. Echinacea eine Rolle spielen.

Schlüsselt man das Phagozytoseverhalten der einzelnen Granulozyten nach der Anzahl der überhaupt phagozytierenden Zellen und den jeweils aufgenommenen Hefepartikeln auf (Abb. 4.5.2.2.2-7 und Abb. 4.5.2.2.9-14), so zeigt sich, daß an den Veränderungen des Phagozytoseindex sowohl Wirkungen auf die Aktivität der Einzelzelle, als auch der gesamten Zellpopulation beteiligt sind.

Die Unterschiede in den Phagozytoseraten von mit Schweineserumpool bzw. mit Fetalem Schweineserumpool opsonisierten Hefezellen lassen - da sich auch die Werte der Kochsalzkontrollen unterscheiden - keine sicheren Rückschlüsse auf mögliche Wirkmechanismen der untersuchten Präparate zu. Möglicherweise sind für die Differenzen unterschiedliche Bedingungen der Serumgewinnung oder -lagerung verantwortlich zu machen.

5.4.2.3 In vivo-Versuch

Im in vivo-Versuch wurde die Wirkung eines echinaceahaltigen Präparates nach intramuskulärer Anwendung beim Schwein untersucht.

Da beim Schwein wiederholte Blutentnahmen nicht ohne Umstände möglich sind, wurde insgesamt nur dreimal Blut gewonnen: neben einem Kontrollwert vor der ersten Applikation wurde am Tag nach der zweiten Injektion die Phagozytoserate gemessen, weil in ähnlichen Untersuchungen beim Menschen zu diesem Zeitpunkt bereits eine maximale Stimulierung der Phagozytose erzielt wurde (WAGNER, 1985). Eine dritte Messung erfolgte zwei Tage nach der letzten Injektion, um eine mögliche Langzeitwirkung des Präparates zu erfassen.

Blutbilder:

An allen Versuchstagen lagen die Werte des weißen Blutbildes im Normalbereich (SCHULZE et al., 1980). Trotzdem ist in der Kontrollgruppe am Tag 8/9 sowohl die Gesamtleukozytenzahl, als auch die Zahl der Neutrophilen Granulozyten verglichen mit Tag 1/2 signifikant erhöht.

Phagozytoseraten (Abb. 4.5.3.2.1):

Die Phagozytoseindizes am Tag 1/2 lagen niedriger als die Kochsalzkontrollwerte der in vitro-Versuche. Dies läßt sich, abgesehen von möglichen anderen Einflüssen, durch das geringere Alter der im in vivo-Versuch untersuchten Tiere erklären (KLEBANOFF and CLARK, 1978).

In der Versuchsgruppe stiegen die Phagozytoseraten nach zweimaliger Applikation von InflueX deutlich und signifikant an. Dieser Anstieg war nicht von Veränderungen im Blutbild begleitet. Am zweiten Tag nach der letzten Injektion war immer noch eine Erhöhung der Phagozytoserate festzustellen, die allerdings nicht statistisch abzusichern ist.

In der Kontrollgruppe stieg die Phagozytoserate nach den ersten Injektionen nicht an, war allerdings am Tag 8/9 stark, aber nicht signifikant erhöht. Diese Erhöhung ist mit der Zunahme der Gesamtleukozytenzahl bzw. der Zahl Neutrophiler Granulozyten im Blut schwach korreliert. Dies legt die Vermutung nahe, daß, im Gegensatz zur Versuchsgruppe, die Zunahme der Phagozytoserate in der Kontrollgruppe

durch die Aktivierung der Granulozyten im Rahmen eines Entzündungsgeschehens erfolgte. Resorptive Entzündungen, ausgelöst durch Hämatombildung bei der Blutentnahme, scheinen als Ursache möglich.

5.4.2.4 Serumeinfluß

Um den Serumeinfluß auf die Phagozytose von Bäckerhefe näher zu charakterisieren, wurden verschieden behandelte Seren zur Opsonisierung eingesetzt (vgl. Seite 58/59).

Nicht opsonisierte Hefe wird nur in geringem Maße phagozytiert.

Dies stimmt mit Beobachtungen bei menschlichen Phagozyten überein, bei denen zwar ein spezifischer Rezeptor für ein mannosehaltiges Zellwand-Oligosaccharid nachgewiesen wurde, der die Inkorporation auslösen, aber aufgrund fehlender enger Anlagerung des Partikels an den Phagozyten (vermittelt durch C3b) nicht wirksam werden kann (DANLEY and HILGERT, 1981, WRIGHT and SILVERSTEIN, 1986).

Unter den gewählten Opsonisierungsbedingungen werden mit Schweineserumpool und mit Fetalem Schweineserumpool behandelte Hefezellen gleich gut phagozytiert.

Inaktiviertes Fetales Schweineserum hat seine opsonisierende Wirkung völlig verloren. Dies ist auf die fehlende C3b-Wirkung zurückzuführen (LEIJH et al., 1977).

Inaktivierter Schweineserumpool wirkt noch relativ gut opsonisierend. Dies kann zum einen auf mögliche spezifische IgG-Antikörper gegen Hefezellwandbestandteile, aber auch über unspezifische Bindung von IgG an die Oberfläche der Hefezellen durch hydrophobe Kräfte bewirkt werden (ABSOLOM, 1986).

Außerdem wurde in diesem Versuchsteil eine Alkohollösung untersucht, die dem Restalkoholgehalt der im Substanzendversuch eingesetzten entalkoholisierten Präparationen entsprach. Diese geringe Alkoholkonzentration scheint die Hefephagozytose von Schweinegranulozyten nicht zu beeinflussen.

5.5 Chemolumineszenz

5.5.1 Methode

Zur Messung der Chemolumineszenz werden stark variierende Methoden angewendet (KLEBANOFF and CLARK, 1978, DECHATELET, 1982, FALCK, 1986). Die eigenen Untersuchungen erfolgten in Anlehnung an die Technik von WINTER (1987):

Als Stimulus wurde, um eine gewisse Vergleichbarkeit mit den Phagozytoseversuchen zu erreichen, opsonisiertes Zymosan (Zellwandbestandteil von *Saccharomyces cerevisiae*) benutzt.

Die Verstärkung der Chemolumineszenz erfolgte mit Luminol, um in Gesamtheit sowohl Effekte der Degranulation, als auch des respiratory burst zu erfassen (EDWARDS, 1987).

Es wurden isolierte Granulozyten untersucht, da dies detailliertere Aussagen über diese Leukozytensubpopulation erlaubt, als die Chemolumineszenz aus dem Vollblut (VAN DYKE et al., 1986).

5.5.2 Ergebnisse

In Vorversuchen wurde eine starke Hemmung der Chemolumineszenz durch die alkoholischen Lösungen festgestellt. Sehr niedrige Alkoholkonzentrationen stimulierten dagegen vereinzelt erheblich. Nachdem bei KLUMPP (1986) und REIFENBERG (1987) Hinweise für eine stimulierende Wirkung von Alkohol auf die Phagozytose beim Huhn zu finden sind, wurden im Chemolumineszenztest neben den entalkoholisierten Influx- und Echinacea-Aufbereitungen auch zwei zusätzliche, niedrig konzentrierte Alkohollösungen untersucht.

Spontane Chemolumineszenz:

Die Chemolumineszenzaktivität in der Vorinkubationszeit (Abb. 4.6.1) steigt in allen Ansätzen kontinuierlich an, um nach 20-25 Minuten ein Plateau zu erreichen. Dies läßt sich möglicherweise durch einen Erholungsvorgang der durch die Zellisolation beeinträchtigen Zellen erklären.

Entalkoholisierte Influentropfen hemmten die spontane Chemolumineszenz von Schweinegranulozyten mäßig, aber signifikant, während die entalkoholisierte Echinacealösung leicht stimulierte. Die untersuchten Alkohollösungen zeigten im Mittel hier nur eine geringe Wirkung (Abb. 4.6.2).

Chemolumineszenz nach Stimulierung mit Zymosan:

Abb. 4.6.3 zeigt den Verlauf der Chemolumineszenzantwort auf die Zugabe von opsonisiertem Zymosan: einem schnellen Anstieg der Aktivität folgt ein etwas langsamerer Abfall.

Die Einflüsse der untersuchten Lösungen auf die Chemolumineszenz der stimulierten Zellen war gering. Influx-Tropfen hemmten leicht, Echinacea ergab eine geringfügige Stimulation (Abb. 4.6.4).

Eine mögliche Beeinflussung der gemessenen Chemolumineszenz über ein unmittelbares Quenching von Lichtimpulsen durch die zugesetzte Influxlösung läßt sich nicht ausschließen, ist aufgrund der geringen Konzentrationen der eingesetzten Lösungen aber eher unwahrscheinlich.

ENBERGS und WOESTMANN (1987) messen nach intramuskulärer Behandlung von Kaninchen mit Echinaceapräparaten eine Steigerung der Chemolumineszenz für verschiedene Dilutionen des Extrakts. WAGNER (1986) stellt ein dosisabhängiges Verhalten der Chemolumineszenz nach Behandlung von menschlichen Probanden mit einem echinaceahaltigen Präparat fest: die höheren Konzentrationen hemmen die durch Zymosan stimulierte Chemolumineszenz mäßig bis stark, die niedrigeren stimulieren leicht bis mäßig.

Insgesamt bestätigen die eigenen Untersuchungen, daß die Chemolumineszenz von Phagozyten zwar ein wertvolles Mittel z.B. zum Aufdecken von groben Defekten der Degranulation oder des respiratory burst darstellen kann, für quantitative Untersuchungen erscheint sie jedoch, nicht zuletzt wegen der großen interindividuellen Schwankungen, nur bedingt geeignet (ERNST et al., 1985, BADWEY et al., 1986).

5.6 Beeinflussung der Granulozytenfunktionen durch Influx

Die Wirkung des echinaceahaltigen Präparates Influx auf die Funktionen von Schweinegranulozyten war uneinheitlich.

Während Funktionen des kontraktiven Apparates der Zelle stimuliert wurden, scheinen Degranulation und respiratory burst eher gehemmt zu werden. Die festgestellten Unterschiede in der stimulierenden Influxwirkung auf Adhärenz, Chemotaxis und Phagozytose spiegeln entweder eine unterschiedliche starke Beeinflussung wieder oder hängen aber von der Sensibilität der Meßsysteme ab. Die Hemmung der spontanen Chemolumineszenz stellt dazu einen deutlichen Kontrast dar. Eine ähnliche Verteilung von stimulierenden und hemmenden Effekten auf die Granulozytenfunktionen wurde allerdings auch für andere Substanzen beschrieben (COTTIER et al., 1980, GNARPE et al., 1984).

Dies läßt sich möglicherweise damit erklären, daß die Wege der Signalübertragung, die zu den einzelnen Phänomenen führen, in unterschiedlicher Weise beeinflußt werden (YULI et al., 1982). Andererseits ist denkbar, daß eine Hemmung des respiratory burst durch Influx die primäre Wirkung ist. Die gebildeten aktiven Sauerstoffspezies schädigen nicht nur, wie beschrieben, Mikroorganismen und umliegendes Gewebe, sondern auch Strukturen des Phagozyten selbst (BAEHNER et al., 1977, YAMAMOTO and JOHNSON, 1984, MADERAZO et al., 1986). Eine Hemmung der Bildung dieser Metaboliten kann das Mikrotubulus- und Mikrofilament-system vor oxidativer Schädigung schützen und so Adhärenz, Chemotaxis und Phagozytose steigern.

Rückschlüsse von der reduzierten spontanen Chemolumineszenz auf eventuell verminderte mikrobizide Fähigkeiten mit Influx behandelter Granulozyten sind nicht ohne weiteres zu ziehen, da zum einen die Chemolumineszenz der stimulierten Zellen kaum herabgesetzt war, zum andern bei reduziertem respiratory burst auch die sauerstoffunabhängigen, mikrobiziden Enzymsysteme vor einer oxidativen Schädigung geschützt sind (WEENING et al., 1982).

Die Ergebnisse des in vivo-Versuches erlauben, da die Zusammensetzung der untersuchten Präparate nicht völlig identisch war, keinen unmittelbaren Rückschluß auf die Übertragbarkeit von in vitro ermittelten Effekten auf in vivo-Verhält-

nisse. Allerdings bestätigen die gleichsinnigen Ergebnisse zumindest tendenziell, daß ein in vitro-Screening von potentiellen Immunstimulantien gewisse Vorhersagen über in vivo-Wirkungen ermöglichen kann.

Über die Wirksamkeit des untersuchten Präparates bei oraler Verabreichung kann anhand der eigenen Ergebnisse keine Aussage gemacht werden. Hinweise für eine Wirkung auf das Abwehrsystem auch bei dieser Applikationsart ergaben die Untersuchungen von KLUMPP (1986).

Die vorliegende Arbeit kann zur Charakterisierung der Wirkung von echinacea-haltigen Präparaten auf die unspezifischen Abwehrkräfte einen Beitrag leisten. Ein abschließendes Urteil über die Tauglichkeit von Immunmodulatoren sollte sich jedoch auf ein möglichst breites Spektrum von in vitro- und in vivo-Tests, insbesondere auch auf Infektionsmodelle und Feldversuche stützen (SEDLACEK et al., 1986). Derartige Untersuchungen und auch solche, die die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf andere Spezies betreffen, bleiben der Zukunft vorbehalten.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Die Stimulierung der Funktionen Neutrophiler Granulozyten kann eine Stärkung der unspezifischen Abwehrkräfte des Organismus darstellen.

Zur Messung der Granulozytenfunktionen beim Schwein wurden in dieser Arbeit bekannte Methoden modifiziert und neue entwickelt.

Im Adhärenztest wurde die Retention von Neutrophilen Granulozyten aus dem Vollblut auf einer standardisierten Glasperlsäule gemessen. Schweinegranulozyten zeigen in diesem Modell eine um 50 % geringere Retention als Neutrophile des Menschen.

Zur Messung von random migration und Chemotaxis wurde eine modifizierte LMAT (leukocyte migration under agarose technique) eingesetzt. Bei gleicher chemotaktischer Wanderung ist die ungerichtete Migration von Schweinegranulozyten etwa dreimal höher als die von menschlichen.

Für die Bestimmung der Phagozytoserate wurden zwei mikroskopische Methoden entwickelt, die eine sichere Unterscheidung zwischen inkorporierten und adhärenzten Phagozytosepartikeln (Hefezellen) zulassen.

Die lichtmikroskopische Methode kombiniert eine Vorfärbung von Hefezellen durch Trypanblau mit einer Gegenfärbung nicht inkorporierter Partikel mit Eosinrot.

Für die fluoreszenzmikroskopische Technik werden Phagozytoseansätze mit Acridinorange gefärbt. Durch Quenching der Fluoreszenz nicht inkorporierter Partikel mit Methyleneblau wird eine korrekte Bestimmung der Phagozytoserate ermöglicht.

Im Chemolumineszenztest werden isolierte Granulozyten sowohl auf ihre spontane, als auch auf ihre Aktivität nach Stimulation mit opsonisiertem Zymosan hin untersucht.

Influx-Tropfen stimulierten bei Anwendung in vitro Adhärenz (+70%), Chemotaxis (+10%) und Phagozytose (+35%), wogegen random migration und die stimulierte Chemolumineszenz nicht beeinflusst wurden. Die spontane Chemolumineszenz wurde durch Influx-Tropfen gehemmt (-23%).

Echinacealösung alleine stimulierte in vitro im Phagozytostest nur vergleichsweise gering (+11%).

Eine schwach konzentrierte Alkohollösung hemmte alle untersuchten Granulozytenfunktionen beim Schwein, mit Ausnahme der random migration.

Die Applikation von Influx-Injektionslösung bei Läuferschweinen stimulierte die Phagozytoseaktivität isolierter Granulozyten um 51%.

Influx-Tropfen beeinflussen die Granulozytenfunktionen sowohl durch die Echinacea-extrakte als auch durch die in homöopathischen Verdünnungsstufen vorliegenden Komponenten. Als Wirkmechanismus kommt möglicherweise eine Verringerung der autooxidativen Schädigung des Zytoskeletts des PMN in Betracht.

7 SUMMARY

INFLUENCE OF PREPARATIONS CONTAINING ECHINACEA EXTRACTS ON SEVERAL FUNCTIONS OF PORCINE NEUTROPHILS.

Stimulation of neutrophil functions may strengthen the non specific defense of the individuum.

In this paper approved methods were adapted for the evaluation of porcine granulocyte functions and new ones were developed.

Adherence was calculated by measurement of retention of PMN from whole blood on a standardized glass bead column. Retention of porcine neutrophils was 50 % of human.

Random migration and chemotaxis were evaluated by a modified LMAT (leukocyte migration under agarose technique). Non directed migration in porcine granulocytes is about three times higher than in human, whereas chemotaxis is similar.

Two methods for the calculation of the rate of phagocytosis have been developed, which allow differentiation between ingested and attached particles (baker's yeast). The light microscope technique works by a combination of trypanblue and eosinred staining.

The fluorescence microscope technique makes use of methyleneblue quenching of non ingested acridinorange stained particles.

Spontaneous light emission of PMN and activity after stimulation with opsonized zymosan were measured in a chemiluminescence assay.

Application of InflueX-drops in vitro increased adherence (+70%), chemotaxis (+10%), and phagocytosis (+35%), whilst random migration and the chemiluminescent response to zymosan were not affected.

Spontaneous chemiluminescence was diminished by InflueX-drops (-23%).

Echinacea extracts alone increased phagocytic activity only slightly (+11%).

A highly diluted ethanol solution depressed all PMN functions examined with the exception of random migration.

After a two day application of the injectable InflueX-preparation to weaner pigs phagocytosis raised to 51 % above pretreatment levels.

InflueX exerts influence on neutrophil functions not only by its Echinacea components but also by the compounds present in homeopathic dilutions.

The stimulating effects of InflueX possibly depend on a reduction of autooxidative damage to PMN cytoskeleton.

8 TABELLARISCHER ANHANG

8.1 Adhärenztest

Blutbilder:

DATUM	LEUKO 10 ⁶ /ml	NEUTRO %	EOSINO %	BASO %	MONO %	LYMPHO %
03.09.	15,5	58	2	0	1	39
29.09.	19,8	62	0	0	1	37
27.10.	15,0	48	0	0	2	50
30.10.	21,1	60	1	1	0	38
11.11.	20,7	75	3	0	1	21
13.11.	14,6	54	1	0	1	44
17.11.	13,4	55	0	0	1	44
20.11.	9,9	54	0	0	1	45
05.02.	18,6	67	1	0	1	31

Tab. 8.1: Blutbilder der im Adhärenztest untersuchten Schweine.

Leuko : Gesamtleukozytengehalt (ohne Korrektur der Verdünnung durch den Gerinnungshemmer)

Neutro : Anteil der Neutrophilen Granulozyten in %

Eosino : Anteil der Eosinophilen Granulozyten in %

Baso : Anteil der Basophilen Granulozyten in %

Mono : Anteil der Monozyten in %

Lympho : Anteil der Lymphozyten in %

8.2 Chemotaxistest

Blutbilder:

DATUM	LEUKO 10 ⁶ /ml	NEUTRO %	EOSINO %	BASO %	MONO %	LYMPHO %
10.02.	17,3	65	0	1	3	31
11.02.(a)	24,1	68	1	0	2	29
11.02.(b)	16,4	54	1	0	1	44
12.02.(a)	16,1	50	3	0	0	47
12.02.(b)	17,2	70	0	0	1	29
15.02.(a)	18,6	61	0	0	2	37
15.02.(b)	17,4	64	1	0	0	34
17.02.(a)	14,1	61	0	0	1	38
17.02.(b)	17,5	57	2	0	1	40

Tab. 8.2.1: Blutbilder der im Chemotaxistest untersuchten Schweine.
(Legende siehe Tab. 8.1)

Random Migration:

DATUM	NaCl	ALK	INFL
10.02.	3,5/4,5/6,0	3,5/5,0/5,5	4,5/4,5/6,0
11.02.(a)	4,5/4,0/4,0	3,5/4,0/3,5	4,0/4,0/4,0
11.02.(b)	4,5/4,5/4,5	5,0/4,5/4,5	4,0/4,0/5,5
12.02.(a)	5,0/5,5/5,5	5,5/5,0/5,5	5,5/6,0/5,5
12.02.(b)	5,5/4,5/5,0	4,5/4,5/4,5	3,5/4,0/5,0
15.02.(a)	5,0/5,5/5,5	5,0/6,0/5,0	5,5/5,5/5,5
15.02.(b)	5,0/5,5/6,0	6,0/6,0/6,5	6,5/6,5/6,0
17.02.(a)	6,5/5,5/5,5	6,0/6,5/6,0	6,5/5,5/7,0
17.02.(b)	6,0/5,0/5,0	5,5/5,0/6,0	5,5/6,0/5,5

Tab. 8.2.2: Random Migration unter Agar.

Auf dem Bildschirm abgemessene Strecken (cm);
jeweils Ergebnisse von 3 Parallelansätzen.

NaCl: Vorinkubation mit Kochsalzlösung

ALK: Vorinkubation mit Äthanollösung

INFL: Vorinkubation mit Influenz-Tropfen, entalkoholisiert

Chemotaxis:

DATUM	NaCl	ALK	INFL
10.02.	5,0/6,0/6,0	3,5/5,5/5,5	6,0/6,0/6,0
11.02.(a)	5,0/4,5/4,5	4,0/4,0/3,5	4,5/5,5/5,0
11.02.(b)	5,5/5,5/5,0	5,0/4,5/4,5	5,5/5,5/6,5
12.02.(a)	6,0/6,0/6,0	6,0/5,0/5,5	7,0/7,0/7,0
12.02.(b)	6,0/5,0/5,0	4,5/4,5/4,5	4,0/5,0/6,0
15.02.(a)	5,5/6,0/6,0	5,0/6,0/5,0	6,5/6,0/6,0
15.02.(b)	6,5/6,5/6,0	6,0/6,0/7,0	7,5/7,5/7,5
17.02.(a)	7,0/6,5/6,5	6,5/6,0/6,5	7,5/6,5/8,0
17.02.(b)	7,0/6,0/6,0	5,5/5,0/6,5	7,5/7,0/7,0

Tab. 8.2.3: Chemotaxis unter Agar.
(Legende siehe Tab. 8.2.2)

8.3 Phagozytostest

8.3.1 Konzentrationsvorversuch

Blutbilder:

DATUM	LEUKO 10 ⁶ /ml	NEUTRO %	EOSINO %	BASO %	MONO %	LYMPHO %
22.04.	13,3	51	1	0	7	42
24.04.	19,8	52	0	0	4	44
26.05.	10,1	57	1	0	5	37
01.06.	18,9	60	0	0	5	35
23.06.	15,6	72	0	0	3	25
24.06.	17,1	71	1	0	4	25
30.06.	12,0	57	2	1	2	38
02.07.	10,2	61	3	0	1	35
07.07.	22,7	55	2	1	3	39

Tab. 8.3.1: Blutbilder der im Konzentrationsvorversuch untersuchten Schweine.
(Legende siehe Tab. 8.1)

Phagozytoseindices:

Tab. 8.3.2-9: Phagozytoseindices für verschiedene Verdünnungsstufen alkoholisch gelöster Influx-Tropfen. Angegeben sind die Werte von je 2 Kochsalzkontrollen und je 3 Vorinkubationszeiten.

DATUM	NaCl 1	NaCl 2	10 min	20 min	30 min	40 min
22.04.	0,82	0,76	0,27	0,46	0,59	
24.04.	0,56	0,64	0,11	0,20	0,30	

Tab. 8.3.2: Phagozytoseindices bei einer Echinacosidkonzentration von 10^{-1} µg/ml Inkubationsansatz.

DATUM	NaCl 1	NaCl 2	10 min	20 min	30 min	40 min
22.04.	0,82	0,76	0,48	0,67	0,92	
24.04.	0,56	0,64	0,47	0,48	0,71	

Tab. 8.3.3: Phagozytoseindices bei einer Echinacosidkonzentration von 10^{-1} µg/ml Inkubationsansatz.

DATUM	NaCl 1	NaCl 2	10 min	20 min	30 min	40 min
22.04.	0,82	0,76	0,64	1,01	0,97	
24.04.	0,56	0,64	0,66	0,47	0,68	
26.05.	0,43	0,47		0,72	1,23	0,63
01.06.	0,70	0,51		0,87	1,01	1,15
23.06.	0,58	0,59		0,66	0,69	0,96
24.06.	0,56	0,80		0,42	0,75	0,84
30.06.	0,38	0,34		0,54	0,58	0,54
02.07.	0,59	0,49		0,52	0,57	0,67
07.07.	0,60	0,57		0,38	0,78	0,52

Tab. 8.3.4: Phagozytoseindices bei einer Echinacosidkonzentration von 10^{-2} µg/ml Inkubationsansatz.

DATUM	NaCl 1	NaCl 2	10 min	20 min	30 min	40min
22.04.	0,82	0,76	0,99	0,87	1,47	
24.04.	0,56	0,64	0,61	0,91	0,97	
26.05.	0,43	0,47		0,61	0,53	0,85
01.06.	0,70	0,51		0,75	1,07	1,16
23.06.	0,58	0,59		0,59	0,67	0,51
24.06.	0,56	0,80		0,49	0,80	0,52
30.06.	0,38	0,34		0,42	0,52	0,62

Tab. 8.3.5: Phagozytoseindizes bei einer Echinacosidkonzentration von 10^{-3} µg/ml Inkubationsansatz.

DATUM	NaCl 1	NaCl 2	10 min	20 min	30 min	40 min
26.05.	0,43	0,47		0,65	0,58	0,82
01.06.	0,70	0,51		0,36	0,60	0,72
23.06.	0,58	0,59		0,62	0,52	0,80
24.06.	0,56	0,80		0,65	0,96	0,60
30.06.	0,38	0,34		0,51	0,48	0,49

Tab. 8.3.6: Phagozytoseindizes bei einer Echinacosidkonzentration von 10^{-4} µg/ml Inkubationsansatz.

DATUM	NaCl 1	NaCl 2	10 min	20 min	30 min	40 min
26.05.	0,43	0,47		0,50	0,66	0,81
01.06.	0,70	0,51		0,97	0,71	0,91
23.06.	0,58	0,59		0,71	0,48	0,72
24.06.	0,56	0,80		0,72	1,00	0,76
30.06.	0,38	0,34		0,51	0,66	0,60
02.07.	0,59	0,49		0,51	0,52	0,49
07.07.	0,60	0,57		0,62	0,53	0,54

Tab. 8.3.7: Phagozytoseindizes bei einer Echinacosidkonzentration von 10^{-5} µg/ml Inkubationsansatz.

DATUM	NaCl 1	NaCl 2	10 min	20 min	30 min	40 min
02.07.	0,59	0,49		0,48	0,65	0,58
07.07.	0,60	0,57		0,38	0,70	0,51

Tab. 8.3.8: Phagozytoseindices bei einer Echinacosidkonzentration von 10^{-6} µg/ml Inkubationsansatz.

DATUM	NaCl 1	NaCl 2	10 min	20 min	30 min	40 min
02.07.	0,59	0,49		0,57	0,48	0,58
07.07.	0,60	0,57		0,49	0,60	0,53

Tab. 8.3.9: Phagozytoseindices bei einer Echinacosidkonzentration von 10^{-7} µg/ml Inkubationsansatz.

8.3.2 Substanzendversuch

Blutbilder:

DATUM	LEUKO 10^6 /ml	NEUTRO %	EOSINO %	BASO %	MONO %	LYMPHO %
16.07.	17,6	65	0	0	5	30
22.07.	18,3	67	0	0	3	30
23.07.	16,2	71	1	0	4	24
24.07.	13,8	68	0	0	2	30
29.07.	13,2	78	3	1	1	17
10.08.	17,1	56	0	0	4	42
11.08.	21,6	67	1	0	3	21
12.08.	14,4	52	3	0	2	43
21.08.	16,1	68	0	0	3	29

Tab. 8.3.10: Blutbilder der im Substanzendversuch untersuchten Schweine.
(Legende siehe Tab. 8.1)

Phagozytoseindices:

DATUM	NaCl 1 NaCl 2	ALK	ECH _{alk}	ECH _{ent}	INFL _{alk}	INFL _{ent}
16.07.	0,69 1,02	0,16	0,31	0,67	0,83	1,17
22.07.	0,99 1,17	0,59	0,91	1,41	1,30	2,00
23.07.	0,53 0,58	0,21	0,27	0,55	0,90	0,58
24.07.	0,68 0,61	0,26	0,10	0,80	0,91	1,08
29.07.	1,17 0,99	0,32	0,67	1,00	1,18	0,93
10.08.	0,56 0,43	0,17	0,27	0,47	0,67	0,83
11.08.	0,68 0,83	0,34	0,48	0,96	0,85	0,75
12.08.	0,80 0,67	0,42	0,33	1,09	0,98	0,92
21.08.	0,73 0,66	0,37	0,49	0,70	1,13	1,02

Tab. 8.3.11: Phagozytoseindices bei Opsonisierung mit

Schweineserumpool.

NaCl 1 bzw. 2: Vorinkubation mit Kochsalzlösung

ALK : Vorinkubation mit Äthanollösung

ECH : Vorinkubation mit alkoholischer Echinacea-Lösung

ECH_{alk} : Vorinkubation mit entalkoholisierter Ech.-Lösung

INFL_{ent} : Vorinkubation mit entalkoholisierten Infl.-Tropfen

INFL_{alk} : Vorinkubation mit entalkoholisierten Infl.-Tropfen

DATUM	NaCl 1 NaCl 2	ALK	ECH _{alk}	ECH _{ent}	INFL _{alk}	INFL _{ent}
16.07.	1,52 0,77	0,52	0,66	1,10	1,24	1,20
22.07.	1,15 1,45	0,69	1,32	0,71	1,35	1,33
23.07.	0,85 0,96	0,41	0,50	0,65	1,02	0,89
24.07.	0,93 0,93	0,72	0,62	1,04	1,03	1,25
29.07.	0,97 1,12	0,57	1,12	1,40	1,30	0,84
10.08.	0,73 0,62	0,36	0,62	0,92	1,08	1,13
11.08.	0,72 0,65	0,57	0,70	0,96	0,84	1,28
12.08.	0,89 0,81	0,50	0,83	1,16	1,11	0,98
21.08.	0,65 0,68	0,38	0,48	0,72	0,92	1,20

Tab. 8.3.12: Phagozytoseindices bei Opsonisierung mit Fetalem Schweineserumpool.
(Legende siehe bei Tab. 8.3.11)

8.3.3 Serumeinfluß

Phagozytoseindizes:

DATUM	N.OPS.	SSP	FSS	SSP _i	FSS _i	SSP/A	FSS/A
24.08.	0,15	0,69	1,09	0,61	0,06	0,60	1,00
25.08.	0,10	0,94	1,03	0,73	0,12	0,85	1,06
26.08.	0,13	1,20	1,20	1,09	0,11	1,19	1,05

Tab. 8.3.13: Phagozytoseindizes bei verschiedenartiger Opsonierung und unterschiedlicher Vorinkubation.

N.OPS.: Hefe nicht opsonisiert, Vorinkubation mit Kochsalzlösung

SSP : Hefe opsonisiert mit Schweineserumpool, Vorinkubation mit Kochsalzlösung

FSS : Hefe opsonisiert mit Fetalem Schweineserumpool, Vorinkubation mit Kochsalzlösung

SSP_i : Hefe opsonisiert mit inaktiviertem Schweineserumpool, Vorinkubation mit Kochsalzlösung

FSS_i : Hefe opsonisiert mit inaktiviertem Fet. Schweineserumpool, Vorinkubation mit Kochsalzlösung

SSP/A: Hefe opsonisiert mit Schweineserumpool, Vorinkubation mit Äthanollösung

FSS/A: Hefe opsonisiert mit Fetalem Schweineserumpool, Vorinkubation mit Äthanollösung

8.3.4 Phagozytosestimulation in vivo

Blutbilder:

SCHW.NR.	LEUKO 10 ⁶ /ml	NEUTRO %	EOSINO %	BASO %	MONO %	LYMPHO %
100	9,0	22	2	0	4	72
122	12,1	31	4	0	2	63
135	10,0	26	4	0	5	65
120	16,9	31	1	0	0	68
137	21,0	27	0	0	2	71
69	16,9	41	2	0	0	57
31	13,0	23	1	0	6	70
4	15,7	27	1	0	2	70

Tab. 8.3.14: Blutbilder am Tag 1/2 der mit Influenza zu behandelnden Schweine.

(Legende siehe Tab. 8.1, Schw. Nr.: Tätowierung des betreffenden Schweines)

SCHW.NR.	LEUKO 10 ⁶ /ml	NEUTRO %	EOSINO %	BASO %	MONO %	LYMPHO %
98	13,2	25	4	0	4	67
36	11,7	20	5	0	1	74
72	10,5	17	5	0	1	77
7	9,7	23	4	0	2	71
93	12,1	25	5	0	1	69
42	11,9	27	1	0	1	71
67	18,3	27	3	0	2	68
113	11,4	27	2	0	3	68

Tab. 8.3.15: Blutbilder am Tag 1/2 der Schweine der Kontrollgruppe.
(Legende siehe Tab. 8.3.14)

SCHW.NR.	LEUKO 10 ⁶ /ml	NEUTRO %	EOSINO %	BASO %	MONO %	LYMPHO %
100	11,5	24	1	1	5	69
122	13,4	33	5	0	1	61
135	8,3	31	1	1	3	64
120	12,2	29	1	0	2	68
137	15,6	46	1	0	2	51
69	14,9	33	1	0	3	63
31	13,3	25	1	0	0	74
4	13,7	37	0	0	2	61

Tab. 8.3.16: Blutbilder am Tag 3/4 der mit InflueX behandelten Schweine.
(Legende siehe Tab. 8.3.14)

SCHW.NR.	LEUKO 10 ⁶ /ml	NEUTRO %	EOSINO %	BASO %	MONO %	LYMPHO %
98	11,0	26	1	0	2	71
36	11,5	21	1	0	2	76
72	12,4	24	3	1	1	71
7	9,8	27	3	0	2	68
93	17,0	37	4	0	1	58
42	8,0	17	5	4	3	71
67	23,6	11	4	1	3	81
113	13,3	43	4	2	4	47

Tab. 8.3.17: Blutbilder am Tag 3/4 der Schweine der Kontrollgruppe.
(Legende siehe Tab. 8.3.14)

SCHW.NR.	LEUKO 10 ⁶ /ml	NEUTRO %	EOSINO %	BASO %	MONO %	LYMPHO %
100	15,0	28	2	1	4	65
122	10,4	27	4	1	2	66
135	10,3	23	4	1	2	70
120	14,4	21	1	0	1	77
137	14,3	54	4	0	3	49
69	15,0	29	3	0	1	67
31	14,0	29	3	0	1	67
4	11,3	28	3	0	0	69

Tab. 8.3.18: Blutbilder am Tag 8/9 der mit InflueX behandelten Schweine.
(Legende siehe Tab. 8.3.14)

SCHW.NR.	LEUKO 10 ⁶ /ml	NEUTRO %	EOSINO %	BASO %	MONO %	LYMPHO %
98	11,9	22	2	0	2	74
36	16,1	17	7	1	4	71
72	16,2	37	4	0	4	55
7	14,9	21	1	0	2	76
93	17,0	30	2	2	1	65
42	14,7	24	4	0	1	71
67	21,5	41	3	0	0	56
113	14,4	39	3	0	1	57

Tab. 8.3.19: Blutbilder am Tag 8/9 der Schweine der Kontrollgruppe.
(Legende siehe Tab. 8.3.14)

Phagozytoseindices:

SCHW.NR.	TAG 1/2	TAG 3/4	TAG 8/9
100	0,36/0,56/0,86	0,62/0,63/0,61	0,37/0,51/0,88
122	0,37/0,56/0,25	0,99/0,44/0,57	0,64/0,45/0,59
135	0,95/0,32/0,70	1,16/1,00/0,68	0,22/0,78/0,63
120	0,27/0,33/0,34	0,42/0,25/0,33	0,30/0,27/0,37
137	0,86/0,42/0,65	0,52/1,02/0,67	0,68/0,28/0,98
69	0,14/0,35/0,40	0,37/0,39/0,44	0,67/0,63/0,80
31	0,53/0,43/0,36	0,49/0,42/0,71	0,39/0,65/0,50
4	0,38/0,22/0,47	0,87/0,78/1,45	0,40/0,63/0,77

Tab. 8.3.20: Phagozytoseindices der mit Influenza behandelten Schweine.
Jeweils Ergebnisse von 3 Parallelansätzen.
Schw.Nr.: Tätowierung des betreffenden Schweines.
Tag 1/2 bzw. 3/4 bzw. 8/9: Tag der Blutentnahme

SCHW.NR.	TAG 1/2	TAG 3/4	TAG 8/9
98	0,52/0,67/0,45	0,31/0,41/0,38	0,45/0,35/0,36
36	0,11/0,13/0,37	0,23/0,29/0,17	0,62/0,46/0,43
72	0,15/0,23/0,19	0,35/0,25/0,24	0,36/0,39/0,26
7	0,22/0,25/0,36	0,23/0,27/0,34	0,27/0,25/0,28
93	0,08/0,20/0,19	0,17/0,27/0,37	0,40/0,52/0,40
42	0,32/0,81/0,39	0,16/0,35/0,55	0,38/0,68/0,31
67	0,30/0,22/0,47	0,23/0,23/0,22	0,37/0,69/0,34
113	0,47/0,35/0,30	0,48/0,31/0,73	0,63/0,93/1,04

Tab. 8.3.21: Phagozytoseindices der Schweine der Kontrollgruppe.
(Legende siehe bei Tab. 8.3.20)

8.4 Chemolumineszenztest

Blutbilder:

DATUM	LEUKO 10 ⁶ /ml	NEUTRO %	EOSINO %	BASO %	MONO %	LYMPHO %
04.09.	14,7	60	2	0	1	37
09.09.	17,2	50	2	1	1	46
29.09.	16,7	57	2	0	2	39
07.10.	11,3	61	0	0	3	36
08.10.	13,0	70	1	1	0	28
12.10.	15,5	62	1	0	1	36
16.10.	19,5	54	3	0	0	43
19.10.	10,1	58	0	0	2	40
22.10.	14,4	64	1	0	0	35

Tab. 8.4.1: Blutbilder der im Chemolumineszenztest untersuchten Schweine.
(Legende siehe Tab. 8.1)

Chemolumineszenz:

DATUM	NaCl 1	NaCl 2	ALK 1	ALK 2	ECH	INFL
04.09.	59,5	97,7	83,5	77,0	79,9	37,9
29.09.	57,9	79,1	74,7	48,0	76,3	53,3
07.10.	38,7	42,6	54,3	72,3	66,8	48,1
08.10.	83,2	78,5	71,9	63,5	87,6	74,0
12.10.	34,0	28,5	42,8	25,0	23,4	23,6
16.10.	128,7	98,8	102,4	71,8	107,1	83,8
19.10.	66,2	85,9	77,4	65,8	66,5	64,1
22.10.	34,4	43,8	44,7	26,4	58,3	12,8

Tab. 8.4.2: Chemolumineszenz der unstimulierten Zellen. Lichtimpulse ($\times 10^6$) integriert über einen Meßzeitraum von 30 Minuten.
NaCl 1 bzw. 2: Inkubation mit Kochsalzlösung
ALK 1: Inkubation mit Äthanollösung $2,4 \times 10^{-3}$ % (v/v)
ALK 2: Inkubation mit Äthanollösung $2,4 \times 10^{-6}$ % (v/v)
ECH : Inkubation mit entalkoholisierter Echinacea-Lösung
INFL : Inkubation mit entalkoholisierten Influenza-Tropfen

DATUM	NaCl 1	NaCl 2	ALK 1	ALK 2	ECH	INFL
04.09.	525,3	575,4	623,9	513,4	594,3	491,8
09.09.	418,0	381,7	464,1	326,8	411,7	425,1
29.09.	582,4	602,1	663,8	792,3	714,5	599,4
07.10.	233,3	226,0	233,4	318,5	278,0	253,1
08.10.	407,0	350,9	341,9	277,6	434,9	347,0
12.10.	199,1	210,9	228,9	232,5	186,2	185,7
16.10.	401,8	350,9	341,9	277,6	434,9	347,0
19.10.	142,8	145,3	147,2	139,5	132,7	137,6
22.10.	337,9	329,5	378,1	315,3	397,7	241,2

Tab. 8.4.3: Chemolumineszenz der stimulierten Zellen. Lichtimpulse ($\times 10^6$) integriert über die ersten 20 Minuten der Meßzeit. (Legende siehe Tab. 8.4.2)

9 LITERATURVERZEICHNIS

ABSOLUM, D.R., 1986

Opsonins and dysopsonins: an overview.

In: *Methods in enzymology*. Volume 132: Immunochemical techniques. Part J: Phagocytosis and cell mediated cytotoxicity (Ed.: DiSabato, G. and J. Everse), Acad. Press. Inc., New York

ALLEN, R.C., R.L. STJERNHOLEN, and R.H. STEELE, 1972

Evidence for the generation of an electronic excitation state in human polymorphonuclear leukocytes and its participation in bactericidal activity.

Biochem. Biophys. Res. Commun. **47**, 679-684

BABIOR, B.M., 1984

Oxidants from phagocytes: agents of defense and destruction.

Blood **64**, 959-966

BADWEY, J.A. and M.L. KARNOVSKY, 1980

Active oxygen species and the functions of phagocytic leukocytes.

Annu. Rev. Biochem. **49**, 695-726

BADWEY, J.A., J.M. ROBINSON, M.J. KARNOVSKY, and M.L. KARNOVSKY, 1986

Reduction and excitation of oxygen by phagocytic leukocytes: biochemical and cytochemical techniques.

In: *Handbook of experimental immunology*. Volume 2: Cellular immunology (Ed.: Weir, D.M.), Blackwell Scientific Publications, New York

BAEHNER, R.L., L.A. BOXER, J.M. ALLEN, and J. DAVIS, 1977

Autooxidation as a basis for altered function by polymorphonuclear leukocytes.

Blood **50**, 327-335

BAGGIOLINI, M., 1982

Phagozyten und Phagozytose hundert Jahre nach Metschnikoff.

Schweiz. Med. Wochenschr. **112**, 1403-1411

BAGGIOLINI, M. and B. DEWALD, 1985

The neutrophil.

Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. **76**(Suppl. 1), 13-20

BARGMANN, W., 1977

Histologie und Mikroskopische Anatomie des Menschen.

Georg Thieme Verlag, Stuttgart

- BARRETT, S.G., K.S. HANSEN, and D.F. BAINTON, 1981
Differentiation of cell surface receptors on normal human bone marrow myeloid precursors.
Brit. J. Haematol. **48**, 491-500
- BASS, D.A., L.R. DECHATELET, and C.E. MCCALL, 1978
Independent stimulation of motility and the oxidative metabolic burst of human polymorphonuclear leukocytes.
J. Immunol. **121**, 172-178
- BEAMAN, L. and B. BEAMAN, 1984
The role of oxygen and its derivatives in microbial pathogenesis and host defense.
Annu. Rev. Microbiol. **38**, 27-48
- BELSHEIM, J., 1981
A modified leukocyte migration under agarose technique (LMAT).
Acta Path. Microbiol. Scand. C **89**, 167-174
- BESTERMAN, J.M. and R.B. LOW, 1983
Endocytosis: a review of mechanisms and plasma membrane dynamics.
Biochem. J. **210**, 1-13
- BEUSCHER, N., 1982
Über die medikamentöse Beeinflussung zellulärer Resistenzmechanismen im Tierversuch.
Arzneimittelforschung **32**(1), 134-138
- BEUSCHER, N., H. BEUSCHER, B. OTTO und B. SCHÄFER, 1977
Über die medikamentöse Beeinflussung zellulärer und humoraler Resistenzmechanismen im Tierversuch.
Arzneimittelforschung **27**, 1655-1660
- BÖYUM, A., 1967
Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood.
Scand. J. Clin. Lab. Invest. **21**(Suppl. 97), 77-82
- BORREGAARD, N., 1985
The respiratory burst of phagocytes: biochemistry and subcellular localisation.
Immun. Lett. **11**, 165-177
- BRANDT, L., 1967
Studies on the phagocytic activity of neutrophil leukocytes with special reference to chronic myeloproliferative conditions and megaloblastic anemia.
Scand. J. Haematol. **Suppl. 2**, 1-126

BROWN, E.J., 1986

The role of extracellular matrix proteins in the control of phagocytosis.
J. Leukocyte Biol. **39**, 579-591

CAIN, J.A., S.L. NEWMAN, and G.D. ROSS, 1987

Role of complement receptor type three and serum opsonins in the neutrophil response to yeast.
Complement **4**, 75-86

CHENOWETH, D.E., T.A. LANE, J.G. ROWE, and T.E. HUGLI, 1980

Quantitative comparisons of neutrophil chemotaxis in four animal species.
Clin. Immunol. Immunopathol. **15**, 525-535

CHEUNG, A.T.W. and M.E. MILLER, 1984

Chemotaxis, chemokinesis, and movement.
In: *White cell mechanics: basic science and clinical aspects* (Ed.: Meiselman, H.J., M.A. Lichtman, and P.L. LaCelle), Alan R. Liss Inc., New York

CHEUNG, K., A.C. ARCHIBALD, and M.F. ROBINSON, 1983

The origin of chemiluminescence produced by neutrophils stimulated by opsonized zymosan.
J. Immunol. **130**(5), 2324-2329

COTTIER, H., M.W. HESS, H.U. KELLER und T. SCHAFFNER, 1980

Chemokinese, Chemotaxis und Funktionen von Phagozyten, mit besonderer Berücksichtigung der Makrophagen.
Verh. Dtsch. Ges. Pathol. **64**, 24-47

CUTLER, J.E., 1974

A simple in vitro method for studies on chemotaxis.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **147**, 471-474

DANLEY, D.L. and A.E. HILGER, 1981

Stimulation of oxidative metabolism in murine polymorphonuclear leukocytes by unopsonized fungal cells: evidence for a mannose-specific mechanism.
J. Immunol. **127**(2), 551-556

DECHATELET, L.R., G.D. LONG, P.S. SHIRLEY, D.A. BASS, M.J. THOMAS, F.W. HENDERSON, and M.S. COHEN, 1982

Mechanism of the luminol-dependent chemiluminescence of human neutrophils.
J. Immunol. **129**(4), 1589-1593

EDWARDS, S.E., 1987

Luminol- and lucigenin-dependent chemiluminescence of neutrophils: role of degranulation.

J. Clin. Lab. Immunol. **22**, 35-39

ELSBACH, P. and J. WEISS, 1985

Oxygen-dependent and oxygen-independent mechanisms of microbicidal activity of neutrophils.

Immunol. Lett. **11**, 159-163

ENBERGS, H. und A. WOESTMANN, 1986

Untersuchungen zur Stimulierung der Phagozytoseaktivität von peripheren Leukozyten durch verschiedene Dilutionen von *Echinacea angustifolia*, gemessen an der Chemolumineszenz aus dem Vollblut.

Tierärztl. Umschau **41**, 878-885

ERNST, H., R. MÜLLER-PEDDINGHAUS, and G. TRAUTWEIN, 1985

Lucigenin-amplified chemiluminescence in blood and synovial fluid phagocytes of pigs with erysipelas arthritis.

Zentralbl. Veterinarmed. (B) **32**, 774-784

FALCK, P., 1986

Investigation of the chemiluminescence response of human neutrophils and mononuclear cells.

Folia Biol. (Praha) **32**, 103-115

FENICHEL, R.L. and M.A. CHIRIGOS, 1984

Immune modulation agents and their mechanics.

Marcel Dekker Inc., New York

FIELD, T.R., M.R. WILLIAMS, and K.J. BUNCH, 1985

An improved method for the isolation of a neutrophil-rich fraction from porcine blood.

Br. Vet. J. **141**, 355-361

FOOTE, C.S., 1979

Detection of singlet oxygen in complex systems: leukocytes and macrophages.

In: Biochemical and clinical aspects of oxygen (Ed.: Caughley, W.S.), Academic Press Inc., New York

FOOTE, C.S., R.B. ABAKERLI, and R.L. CLOUGH, 1981

On the question of singlet oxygen production in polymorphonuclear leukocytes.

In: Bioluminescence and chemiluminescence (Ed.: DeLuca, M.A. and W.D. McElroy), Academic Press Inc., New York

FROMTLING, R.A. and G.K. ABRUZZO, 1985

Chemiluminescence as a tool for the evaluation of antimicrobial agents: a review.

Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol. **7**, 493-500

GAETHGENS, P., 1984

Deformation and activation of leukocytes - two contradictory phenomena?

In: White cell mechanics: basic science and clinical aspects (Ed.: Meiselman, H.J., M.A. Lichtman, and P.L. LaCelle), Alan R. Liss Inc., New York

GALLIN, J.I., 1984

Human neutrophil heterogeneity exists, but is it meaningful?

Blood **63**, 977-983

GALLIN, J.I., H.L. GALLIN, H.L. MALECH, and E.B. CRAMER, 1978

Structural and ionic events during leukocyte chemotaxis.

In: Leukocyte chemotaxis: methods, physiology and clinical implications (Ed: Gallin, J.I. and P.G. Quie), Raven Press, New York

GAY, J.C., J.K. BECKMAN, A.R. BRASH, J.A. OATES, and J.N. LUKENS, 1984

Enhancement of chemotactic factor-stimulated neutrophil oxidative metabolism by leukotriene B₄.

Blood **64**, 780-785

GNARPE, H., J. BELSHEIM, C. BLOMQVIST, and A. LUNDBÄCK, 1984

Stimulation of granulocyte functions in vitro by imipenem and the renal enzyme inhibitor MK 0791.

Antimicrob. Agents Chemother. **25**, 179-181

GORDON, A.H. and A. KOJ, 1985

Research monographs in cell and tissue physiology. Volume 10: The acute-phase response to injury and infection.

Elsevier, Amsterdam

GRIFFIN, F.M., J.A. GRIFFIN, J.E. LEIDER, and S.C. SILVERSTEIN, 1975

Studies on the mechanism of phagocytosis (I). Requirements for circumferential attachment of particle-bound ligands to specific receptors on the macrophage plasma membrane.

J. Exp. Med. **142**, 1263-1282

HALLENGREN, B. and A. FORSGREN, 1978

Effect of alcohol on chemotaxis, adherence, and phagocytosis of human polymorphonuclear leukocytes.

Med. Scand. **204**, 43-48

- HARLAN, J.M., B.R. SCHWARTZ, W.J. WALLIS, and T.H. POHLMAN, 1987
The role of neutrophil membrane proteins in neutrophil emigration.
In: Leukocyte emigration and its sequelae (Ed.: Movat, H.Z.), Karger, Basel
- HARTWIG, J.H., 1986
Actin filament architecture and movements in macrophage cytoplasm.
In: Biochemistry of macrophages. Ciba Foundation Symposium 118 (Ed.: Evered, D., J. Nugent, and M. O'Connor), Pitman, London
- HED, J., 1977
The extinction of fluorescence by crystal violet and its use to differentiate between attached and ingested microorganisms in phagocytosis.
Fed. Europ. Microbiol. Soc. Lett. **1**, 357-361
- HURST, N.P., 1987
Molecular basis of activation and regulation of the phagocyte respiratory burst.
Annals Rheum. Dis. **46**, 265-272
- ISHIBASHI, Y. and T. YAMASHITA, 1987
Effects of a phagocytosis-stimulating factor derived from polymorphonuclear neutrophils on the function of macrophages.
Infect. Immun. **55**(8), 1762-1766
- KARNOVSKY, M.L. and L. BOLIS, 1982
Phagocytosis - past and future.
Academic Press Inc., New York
- KARNOVSKY, M.L. and J.A. BADWEY, 1986
Respiratory burst during phagocytosis: an overview.
In: Methods in enzymology. Volume 132: Immunochemical techniques. Part J: Phagocytosis and cell mediated cytotoxicity (Ed.: DiSabato, G. and J. Everse), Academic Press Inc., New York
- KLEBANOFF, S.J., 1980
Oxygen intermediates and the microbicidal event.
In: Mononuclear phagocytes: functional aspects (Ed.: Van Furth, R.), Martinus Nijhoff, The Hague
- KLEBANOFF, S.J. and R.A. CLARK, 1978
The neutrophil: function and clinical disorder.
North-Holland, Amsterdam
- KLEMPNER, M.S. and J.I. GALLIN, 1978
Separation and functional characterization of human neutrophil subpopulations.
Blood **51**, 659-669

KLUMPP, N., 1986

In vivo Untersuchungen zur Wirkung von Influe^x_R bzw. Alkohol auf das Abwehrsystem verschiedener Hühnerlinien nach oraler Verabreichung.
Vet. Med. Diss., Universität München

KRAFT, W. und U.M. DÜRR, 1981

Kompodium der klinischen Laboratoriumsdiagnostik bei Hund Katze Pferd.
Verlag M. & H. Schaper, Hannover

LEHRER, R.I. and M.J. CLINE, 1969

Interaction of *Candida albicans* with human leukocytes and serum.
J. Bacteriol. **98**, 996-1003

LEIJH, P.C.J., M.T. VAN DEN BARSELAAR, and R. VAN FURTH, 1977

Kinetics of phagocytosis and intracellular killing of *Candida albicans* by human granulocytes and macrophages.
Infect. Immun. **17**, 313-318

LEIJH, P.C.J., R. VAN FURTH, and T.L. VAN ZWET, 1986

In vitro determination of phagocytosis and intracellular killing by polymorphonuclear and mononuclear phagocytes.
In: Handbook of experimental immunology. Volume 2: Cellular immunology (Ed.: Weir, D.M.), Blackwell Scientific Publications, New York

LEVITZ, S.M., D.J. DIBENEDETTO, and R.D. DIAMOND, 1987

A rapid fluorescent assay to distinguish attached from phagocytized yeast particles.
J. Immunol. Meth. **101**, 37-42

LORENTE, F., G. FONTAN, M.C.G. RODRIGUEZ, and J.A. OJEDA, 1978

A simple and reproducible method to evaluate granulocyte adherence.
J. Immunol. Meth. **19**, 47-51

MACGREGOR, R.R., P.J. SPAGNUOLO, and A.L. LENTNEK, 1974

Inhibition of granulocyte adherence by ethanol, prednisone, and aspirin, measured with an assay system.
N. Engl. J. Med. **291**, 642-646

MACGREGOR, R.R., E.J. MACARAK, and N.A. KEFALIDES, 1978

Comparative adherence of granulocytes to endothelial monolayers and nylon fiber.
J. Clin. Invest. **61**, 697-702

- MADERAZO, E.G., C.L. WORONICK, S.D. ALBANO, S.P. BREAU, and R.M. POCK, 1986
Inappropriate activation, deactivation and probable autooxidative damage as a mechanism of neutrophil locomotory defect in trauma.
J. Infect. Dis. **154**(3), 471-477
- MARKERT, M. and J. FREI, 1981
Biochemical events related to phagocytosing cells.
Adv. Clin. Chem. **22**, 125-162
- MEGE, J.L., C. CAPO, A.M. BENOLIEL, and P. BONGRAND, 1986
Self-limitation of the oxidative burst of rat polymorphonuclear leukocytes.
J. Leukocyte Biol. **39**, 599-616
- MOVAT, H.Z., 1985
The inflammatory reaction.
Elsevier, Amsterdam
- NAKAYAMA, S., J. RODRIGUEZ-PINZON, S. NAKAMURA, and M. YOSHIMAGA, 1982
A possible role of PMN in a casein-induced enhancement of PFC response to sheep erythrocytes in mice.
Immunology **45**, 669-677
- NELSON, R.D., P.G. QUIE, and R.L. SIMMONS, 1975
Chemotaxis under agarose: a new and simple method for measuring chemotaxis and spontaneous migration of human polymorphonuclear leukocytes and monocytes.
J. Immunol. **115**, 1650-1656
- ODA, T. and H. MAEDA, 1986
A new simple fluorometric assay for phagocytosis.
J. Immunol. Meth. **88**, 175-183
- PAROD, R.J. and J.D. BRAIN, 1986
Immune opsonin-independent phagocytosis by pulmonary macrophages.
J. Immunol. **136**, 2041-2046
- PEARSE, A.G.E., 1980
Histochemistry, theoretical and applied. Volume 1: Preparative and optical technology.
Gower Medical Publishing, London
- RASP, F.L., C.C. CLAWSON, J.R. HOIDA., and J.E. REPINE, 1979
Quantitation and scanning electron microscopic comparison of human alveolar macrophage and polymorphonuclear leukocyte adherence to nylon fibers in vitro.
J. Retend. Soc. **25**, 101-109

REIFENBERG, K., 1987

Einfluß echinaceahaltiger Präparate auf die in vitro Phagozytose von mononukleären Hühnerzellen.

Vet. Med. Diss., Universität, München

REPO, H., 1977

Leukocyte migration agarose test for the assessment of human neutrophil chemotaxis.

Scand. J. Immunol. **6**, 203-209

ROITT, I., J. BROSTOFF, and D. MALE, 1985

Immunology

Gower Medical Publishing, London

ROSENBERG, J.S., M.J. MELNICOFF, and P. WILDING, 1985

Fc-receptors for IgG on human neutrophils: analysis of structure and function by using monoclonal antibody probes.

Clin. Chem. **31**, 1444-1448

ROSSI, F., P. BELLAVISTE, and E. PAPINI, 1986

Respiratory response of human phagocytes: terminal NADPH oxidase and the mechanisms of its activation.

In: Biochemistry of macrophages. Ciba Foundation Symposium 118 (Ed.: Evered, D., J. Nugent, and M. O'Connor), Pitman, London

ROTH, J.A. and M.L. KAEBERLE, 1981

Isolation of neutrophils and eosinophils from peripheral blood of cattle and comparison of their functional activities.

J. Immunol. Meth. **45**, 153-164

SCHNEIER, J., J.A. GALL, A.I. CARPE, and D.R. BOGGS, 1977

Factors influencing neutrophil retention on glass bead columns.

Scand J. Haematol. **19**, 435-442

SCHRAUFSTÄTTER, I.U., P.A. HYSLOP, J. JACKSON, and C.C. COCHRANE, 1987

Mechanisms of oxidant injuries of cells.

In: Leukocyte emigration and its sequelae (Ed.: Movat, H.Z.), Karger, Basel

SCHULZE, W., K. BICKHARDT, W. BOLLWAHN, G. V. MICKWITZ und H. PLONAIT, 1980

Klinik der Schweinekrankheiten.

Verlag M. & H. Schaper, Hannover

- SEDLACEK, H.H., G. DICKNEITE, and H.U. SCHORLEMMER, 1986
Screening for chemoimmunotherapeutics: success rate and predictivity of models: a five years experience.
Behring Inst. Mitt. **80**, 74-92
- SEOW, W.K., L. SI-YING, and Y.H. THONG, 1986
Inhibitory effects of tetrandrine on human neutrophil and monocyte adherence.
Immunol. Lett. **13**, 83-88
- SIEGEL, S., 1976
Nichtparametrische statistische Methoden.
Fachbuchhandlung für Psychologie, Frankfurt
- SKLAR, L.A., 1986
Ligand-receptor dynamics and signal amplification in the neutrophil.
Adv. Immunol. **39**, 95-136
- SMITH, G.S., J.H. LUMSDEN, and B.P. WILCOCK, 1981
Pig neutrophil adherence in experimentally induced Salmonellosis.
Am. J. Vet. Res. **42**, 1251-1252
- SMITH, G.S. and J.H. LUMSDEN, 1983
Review of neutrophil adherence, phagocytosis and killing.
Vet. Immunol. Immunopathol. **4**, 177-236
- SMITH, G.S., J.H. LUMSDEN, and B.P. WILCOCK, 1985
Chemotaxis of porcine neutrophils under agarose.
Canad. J. Comp. Med. **49**, 43-49
- SNYDERMAN, R. and E.J. GOETZL, 1981
Molecular and cellular mechanisms of leukocyte chemotaxis.
Science **213**, 830-837
- SNYDERMAN, R. and M.C. PIKE, 1984
Chemoattractant receptors on phagocytic cells.
Annu. Rev. Immunol. **2**, 257-281
- SPISANI, S., E. VICENZI, and S. TRANIELLO, 1982
Interaction between neutrophils and mediators of inflammation.
In: Advances in experimental medicine and biology. Volume 141: Biochemistry and function of phagocytes (Ed.: Rossi, F. and P. Patriarca), Plenum Press, New York

- STICKLE, J.E., H.W. TVEDTEN, W.D. SCHALL, and C.W. SMITH, 1986
Adherence of neutrophils from dogs with Diabetes mellitus.
Am. J. Vet. Res. **47**(3), 541-543
- STOSSEL, T.P., 1978
The mechanism of leukocyte locomotion.
In: *Leukocyte chemotaxis: methods, physiology and clinical implications* (Ed.: Gallin, J.I. and P.G. Quie), Raven Press, New York
- STÜBNER, G., 1983
Über ein Verfahren zur gleichzeitigen Beurteilung der Phagozytosekapazität und -aktivierung neutrophiler Granulozyten.
Arzneimittelforschung **33**, 1592-1594
- TARGOWSKI, S.P. and M. NIEMIALTOWSKY, 1986
Appearance of Fc-receptors on polymorphonuclear leukocytes after migration and their role in phagocytosis.
Infect. Immun. **52**(3), 798-802
- VALERIUS, N.H., 1984
Chemotaxis of neutrophil granulocytes.
Dan. Med. Bull. **31**, 458-474
- VAN DYKE, K., M.R. VAN SCOTT, and V. CASTRANOVA, 1986
Measurement of phagocytosis and cell-mediated cytotoxicity by chemiluminescence.
In: *Methods in enzymology. Volume 132: Immunochemical techniques. Part J: Phagocytosis and cell mediated cytotoxicity* (Ed.: DiSabato, G. and J. Everse), Academic Press Inc., New York
- VAN FURTH, R. and M.M.C. DIESSELHOFF-DEN DULK, 1980
Method to prove ingestion of particles by human macrophages with light microscopy.
Scand. J. Immunol. **12**, 265-269
- VAN OSS, C.J., 1986
Phagocytosis: an overview.
In: *Methods in enzymology. Volume 132: Immunochemical techniques. Part J: Phagocytosis and cell mediated cytotoxicity* (Ed.: DiSabato, G. and J. Everse), Academic Press Inc. New York
- VERGHESE, M.W., C.D. SMITH, R.J. UHING, and R. SNYDERMAN, 1987
Role of a guanine nucleotide regulatory protein in the polyphosphoinositide pathway of leukocyte activation by chemoattractant receptors.
In: *Leukocyte emigration and its sequelae* (Ed.: Movat, H.Z.), Karger, Basel

WAGNER, H., 1985

Neue Untersuchungen über die immunstimulierende Wirkung einiger pflanzlicher Homöopathika.

Biol. Med. **2**, 399-407

WAGNER, H., 1986

Immunstimulantien und Phytotherapeutika.

Zeitschrift Phytother. **7**, 91-98

WAGNER, H., A. PROKSCH, I. RIESS-MAURER, A. VOLLMAR, S. ODENTHAL, H. STUPPNER, K. JURCIC und M. LETURDU, 1985

Immunstimulierend wirkende Polysaccharide (Heteroglykane) aus höheren Pflanzen.

Arzneimittelforschung **35**, 1069-1075

WAGNER, H., K. JURCIC, A. DOENICKE, E. ROSENHUBER und N. BEHRENS, 1986

Die Beeinflussung der Phagozytosefähigkeit von Granulozyten durch homöopathische Arzneimittel.

Arzneimittelforschung **36**, 1421-1425

WALLACH, D.F.H., 1987

Fundamentals of receptor molecular biology.

Marcel Dekker Inc., New York

WARD, P.A., J.S. WARREN, and K.J. JOHNSON, 1987

Leukocytic oxygen products and their diverse biological effects.

In: Leukocyte emigration and its sequelae (Ed.: Movat, H.Z.), Karger, Basel

WEENING, R.S., A.A. VOETMAN, L.J. MEERHOF, A.A.M. BOT, and D. ROOS, 1982

Oxidative damage to lysosomal enzymes in human phagocytosing neutrophils.

In: Advances in experimental medicine and biology. Volume 141: Biochemistry and function of phagocytes (Ed.: Rossi, F. and P. Patriarca), Plenum Press, New York

WHITE, E.H., O. ZAFIRIOU, H.H. KAGE, and J.H.M. HILL, 1964

Chemiluminescence of luminol: the chemical reaction.

J. Am. Chem. Soc. **86**, 940-941

WINTER, M., 1987

Ein Vergleich mehrerer Methoden zur Messung der Phagozytoseaktivität von Granulozyten des Schweines.

Vet. Med. Diss., Universität München

WRIGHT, D.E. and J.I. GALLIN, 1979

Secretory responses of human neutrophils: exocytosis of specific (secondary) granules by human neutrophils during adherence in vitro and during exudation. *J. Immunol.* **123**, 285-294

WRIGHT, S.D., 1986

Methods for the study of receptor-mediated phagocytosis.

In: *Methods in enzymology*. Volume 132: Immunochemical techniques. Part J: Phagocytosis and cell mediated cytotoxicity (Ed.: DiSabato, G. and J. Everse), Academic Press Inc., New York

WRIGHT, S.D. and S.C. SILVERSTEIN, 1986

Overview: the function of receptors in phagocytosis.

In: *Handbook of experimental immunology*. Volume 2: Cellular immunology (Ed.: Weir, D.M.), Blackwell Scientific Publications, New York

WÜRDINGER, M., 1986

Beeinflussung der humoralen Immunreaktion durch Influenza^R und *Echinacea angustifolia* Extrakt.

Vet. Med. Diss., Universität München

YAMAMOTO, K. and R.B. JOHNSON JR., 1984

Dissociation of phagocytosis from stimulation of the oxidative metabolic burst in macrophages.

J. Exp. Med. **159**, 405-416

YEAMAN, G.R. and M.A. KERR, 1987

Opsonisation of yeast by human serum IgA anti-mannan antibodies and phagocytosis by human polymorphonuclear leukocytes.

Clin. Exp. Immunol. **68**, 200-208

YULI, I., A. TOMONAGA, and R. SNYDERMAN, 1982

Chemoattractant receptor functions in human polymorphonuclear leukocytes are divergently altered by membrane fluidizers.

Proc. Nat. Acad. Sci. USA **79**, 5906-5910

ZGLICZYNSKI, J.M., E. OLSZOWSKA, S. OLSZOWSKY, T. STELMASZYNSKA, and E. KWASNOWSKA, 1985

A possible origin of the chemiluminescence in phagocytosing neutrophils. Reaction between chloramines and H_2O_2 .

Int. J. Biochem. **17**, 515-519

Herrn Prof. Dr. U. Lösch danke ich herzlich für die Überlassung des Themas und sein konstruktives Interesse an der Durchführung der Arbeit.

Für den zur Verfügung gestellten Arbeitsplatz danke ich Herrn Prof. Dr. M. Merkschlager und Herrn Prof. Dr. H. Zucker.

Herrn Dr. K. Reifenberg danke ich für die Einführung in das Arbeitsgebiet und seine engagierte Unterstützung von Versuchsplanung und -ausführung.

Allen Mitarbeitern der Labors Lösch danke ich für ihre freundliche Mithilfe und die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Herrn Prof. Dr. Dr.h.c.mult. A. Mayr und Herrn Prof. Dr. H. Buschmann danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes am Chemo-lumineszenzzähler, in dessen Bedienung mich freundlicherweise Herr Dr. M. Winter einwies.

LEBENS LAUF

- 22.03.1960 geboren in Schwäbisch Gmünd, als Sohn von
Karlmann Stahl, Beamter und
Erika Stahl, geborene Geiger, Erzieherin
- 1966 - 1970 Besuch der Mozart-Schule in Schwäbisch Gmünd -
Hussenhofen
- 1970 - 1979 Besuch des Parler-Gymnasiums in Schwäbisch
Gmünd
- 19.06.1979 Reifeprüfung
- 1979 - 1980 Grundwehrdienst
- 1980 - 1986 Studium der Tiermedizin an der Ludwig-Maximilians-
Universität München
- 09.01.1986 Staatsexamen
- 28.01.1986 Approbation als Tierarzt
- 02/'86 - 11/'86 Assistenztierarzt in einer Gemischtpraxis in Baden-
Württemberg
- 12/'86 Beginn der Arbeit an der vorliegenden Dissertation
- 03/'87 - 08/'87 Anstellung als teilbeschäftigte wissenschaftliche
und seit 03/'88 Hilfskraft am Institut für Physiologie, Ernährungs-
physiologie und Biochemie der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

